

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

---



**Perla Lopes de Freitas**

**“O papel do eixo intestino-fígado no desenvolvimento de distúrbios metabólicos associados à introdução dietética precoce de açúcares de adição e o potencial fitoterapêutico das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels”**

São Luís-MA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Perla Lopes de Freitas**

**“O papel do eixo intestino-fígado no desenvolvimento de distúrbios metabólicos associados à introdução dietética precoce de açúcares de adição e o potencial fitoterapêutico das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Co-orientador: Dr. Lucas Martins França

São Luís-MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Freitas, Perla Lopes de.

O papel do eixo intestino-fígado no desenvolvimento de distúrbios metabólicos associados à introdução dietética precoce de açúcares de adição e o potencial fitoterapêutico das folhas de *Syzygium cumini* L. Skeels / Perla Lopes de Freitas. - 2021.

197 f.

Coorientador(a): Lucas Martins França.

Orientador(a): Antonio Marcus de Andrade Paes.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2021.

1. Dieta rica em sacarose. 2. Hipertrigliceridemia. 3. Microbiota intestinal. 4. Polifenóis. 5. *Syzygium cumini*. I. França, Lucas Martins. II. Paes, Antonio Marcus de Andrade. III. Título.

Perla Lopes de Freitas

**“O papel do eixo intestino-fígado no desenvolvimento de distúrbios metabólicos associados à introdução dietética precoce de açúcares de adição e o potencial fitoterapêutico das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde

A comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Doutorado em ciências da Saúde, em sessão pública realizada no dia \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ considerou a candidata

( ) APROVADA

( ) REPROVADA

---

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes – Universidade Federal do Maranhão – UFMA –  
(Presidente).

---

Dr. Fernando Forato Anhô – McMaster University, Hamilton, ON, CA.

---

Profa. Dra. Cecília Claudia Costa Ribeiro - Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

---

Profa. Dra. Hivana Patricia Melo Barbosa Dall’gnol - Universidade Federal do Maranhão –  
UFMA.

---

Profa. Dra. Adalgisa de Souza Paiva Ferreira - Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Deus, em primeiro lugar, por todas as bênçãos e por nunca ter deixado o desânimo permanecer. Gratidão por ter me dado a coragem e a força necessária para superar obstáculos e limites, muitos deles impostos por mim mesma. Gratidão por todas as pessoas que cruzaram o meu caminho ao longo de toda essa jornada. Agradeço a todos, os que ficaram e aqueles que precisaram seguir seu caminho, mas que me deixaram lições. Todos foram importantes em algum momento. Obrigada por todos aqueles que me ampararam, que me incentivaram e que fizeram os meus dias mais felizes!

Ao meu orientador, meu querido professor, Antonio Marcus de Andrade Paes, muito obrigada! Obrigada por ter me aceito no LeFisio, ainda em 2015 e por ter me dado um norte no ano seguinte para que eu fizesse a seleção do doutorado. Ao longo dessa jornada até aqui, eu fui constantemente desafiada por você. E, em todos esses desafios, eu tentei fazer o melhor que pude, respeitando claro, as minhas limitações e dificuldades. Mas eu fiz o meu melhor, sempre! E graças a você, eu sei que hoje eu sou uma aluna e uma professora melhor! Miss you already!

Ao meu co-orientador, Lucas Martins França, a minha eterna gratidão por ter estado comigo na bancada em todos esses anos. Por ter me ensinado tanto, pela escuta generosa, por todas as palavras de incentivo, de amparo, por todas as sugestões e críticas. Você foi fundamental para que este trabalho acontecesse e para que eu hoje pudesse estar aqui, agora, escrevendo essas palavras e escrito esta Tese. Nada que eu faça nessa vida por você poderá recompensar tudo o que você fez por mim!

Ao grupo LeFisio, o grupo que tão generosamente me acolheu e que fez com que eu me sentisse tão em casa. A todos que estiveram sempre ao meu lado, em todos os momentos, principalmente durante os experimentos e em todos os momentos de alegria que tivemos. Obrigada por terem me ensinado sobre a rotina do laboratório e dos experimentos. Obrigada por fazerem parte da minha vida: Bruninho, Karla, Samira, Jonas, Nathalee, Vinycius, Thamyres, Thaianne, Thamys, Savanna, Ludmilla, Ivana, Carol, Renata, Renatinho, Gilberto, Mariana, Amanda, Victor e Suenna.

Em especial, a Caio Fernando Coelho, meu eterno partner! Obrigada por ter me acolhido e me ensinado a segurar um camundongo, a fazer gavagem e me ensinado sobre toda a rotina de lidar com os animais. Obrigada por ter sido meu parceiro de todos os dias de LeFisio!

Aos meus eternos IC's, aos alunos do projeto desbravador: Marcus Barros, João Paulo e Romulo Brenno. Vocês ajudaram a fazer o nosso projeto acontecer. Muito obrigada por toda a ajuda em todos os momentos, em todos os experimentos! Foi tudo mais possível e mais feliz com vocês ao meu lado!

À McMaster University, ao Farncombe e ao Sloboda Lab (Hamilton, ON, CA) pela colaboração com as análises da microbiota intestinal. Em especial, a profa. Deborah Sloboda, por gentilmente ter me recebido em seu laboratório por 3 meses. Por todo o acolhimento e cuidado dispensados a mim enquanto estive lá. E, acima de tudo, por me permitir conhecer essa universidade fantástica. A você, Deb, toda a minha gratidão e admiração. Agradeço também aos alunos do Sloboda Lab, em especial a Katherine Kennedy, pela colaboração com as análises da microbiota. Aos meus professores de Inglês da McMaster: Drew, Angela, Yasmin e Marta,

meu eterno agradecimento por terem me ajudado nas aulas de Inglês. Por fazerem os meus dias no Canadá mais felizes!

O meu agradecimento todo especial à Tatiane Ribeiro e Richelmy Domingos, por terem me acolhido em Hamilton, CA. Vocês foram anjos em minha vida. Pessoas direcionadas por Deus para me amparar e me acolher em uma situação desafiadora e nova para mim. Estar longe de casa, da minha família, dos meus amigos, do meu povo, do meu País. Obrigada por terem me recebido no Canadá e em sua casa. Por terem alegrado os meus dias, por terem partilhado comigo afeto e amor. Serei eternamente grata!

Aos demais brasileiros que conheci no Canadá e que também me acolheram e me fizeram companhia: Irandir, Carmem, Tatiana Ferrari e Camila Araújo. Muito obrigada! Miss you!

Aos parceiros, amigos de trabalho da Escola São Vicente de Paulo: Ana Cristina, Adalgisa, Walcléa, Leticia Tereza, Jandilene, Georgiana, Jaqueline, muito obrigada pelo apoio, amizade e incentivo ao longo de todos esses anos! Aos amigos da Escola Bacelar Portela, em especial, a Vera Lúcia, que sempre esteve ao meu lado. Gratidão pela parceria de todos esses anos! Aos amigos da Faculdade Estácio, em particular, as minhas irmãs Elizangela e Isaura (*in memoriam*) e nossa “mãezinha” Jacqueline Maranhão. Muito obrigada pelos anos de amizade, apoio, incentivo e afeto partilhados comigo. À minha amiga-irmã, Marina Rocha, que vem me acompanhando nessa jornada e sempre me incentivando, me apoiando, me escutando generosamente. Obrigada pelas palavras de luz e amor!

Obrigada àqueles que participaram indiretamente dessa conquista: Socorro Balby, Adriana Sá, Letice França, Romulo Pires, Sofia Sales, Márcia Maria, Vanessa Ribeiro e Mayara Ingrid. Obrigada por dividirem essa jornada comigo e sempre caminharem ao meu lado!

Aos colegas do IEMA UP Itaquí-Bacanga: Elsom Santos, Ildenice, Aluizio, Márcia, David, Said, Wesdney e Leão. Obrigada pela parceria, compreensão e paciência nesses últimos meses.

Às agências financiadoras CNPq e FAPEMA pelos auxílios concedidos ao nosso projeto, as bolsas de iniciação científica dos alunos que participaram do projeto e pela concessão da bolsa de estágio internacional.

À Secretaria de educação do estado do MA (Seeduc-MA) pela concessão da licença para a realização do doutorado.

Aos meus avós (*in memoriam*), Dori e Zuleide, pelo amor e ensinamentos.

Aos meus pais, Messias (*in memoriam*) e Maroca, por me darem a vida e por terem feito o seu melhor para que eu pudesse estar aqui hoje.

Ao meu filho, Vinicius, pelo amor e parceria.

Aos meus irmãos, Leandro e Lenes, pela partilha da amizade e da jornada.

Aos meus tios, tias, primos e primas pela amizade e companheirismo.

## **LISTA DE SIGLAS**

**ABTS<sup>+</sup>** - *2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid*

**AGCC** – Ácidos graxos de cadeia curta

**AGL** – Ácidos graxos livres

**Akt** – Proteína quinase B

**AMPK**- proteína quinase ativada por AMP

**CAT** – Catalase

**CT** – Colesterol total

**CTR** – Controle

**DAG** – Diacilgliceróis

**DHGNA** – Doença hepática gordurosa não-alcoólica

**DHAP** - Dihidróxiacetonafofato

**DM2** – *Diabetes mellitus tipo 2*

**DPPH** – *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

**DRG** – Dieta rica em gordura

**DRS** – Dieta rica em sacarose

**EH** – Extrato hidroalcoólico

**EHNA** – Esteatose hepática não-alcoólica

**European MetaHIT** – *European Metagenomics of the Human Intestinal Tract*

**FIAF** – Fator adipocitário induzido por jejum

**FFA** – *Free fatty acid*

**FFAR2** – *Free fatty acid receptor 2*

**FFAR3** – *Free fatty acid receptor 3*

**FOS** - fruto-oligossacarídeos

**FOXO1** – *forkhead box O1*

**GF** – *Germ-free*

**GL** – Glicose

**GLP-1** – Peptídeo semelhante a glucagon tipo-1

**GNI** – Gliconeogênese intestinal

**GLUT4** – Proteína transportadora de glicose 4

**GRP** - G-protein coupled receptor

**GRP41** – *G protein-coupled receptor 41*



**GRP43** – *G protein-coupled receptor 43*  
**GRP78** – *Glucose-regulated protein 78*  
**GSK3** – Glicogênio sintase quinase 3  
**GSH** – Glutathiona reduzida  
**GTT** – *Glucose tolerance test*  
**HCC** – Hepatocarcinoma  
**HDL** – *High-density lipoprotein*  
**HDAC** – *Histone deacetylase*  
**HMG-CoA** – *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA*  
**HSD** – *High sugar diet*  
**IL** – Índice de Lee  
**IL-1** – Interleucina -1  
**IL-6** – Interleucina - 6  
**IMC** – Índice de Massa Corpórea  
**IRS1** – Receptor de insulina 1  
**ITT** – *Insulin tolerance test*  
**LBP** - Proteína ligadora de LPS  
**LDL** – *Low-density lipoprotein*  
**LDN** – Lipogênese *de novo*  
**LPS** – Lipopolissacarídeo  
**LPL** – Lipoproteína lipase  
**MCT1** - Monocarboxylate transporter 1  
**MetS** – *Metabolic syndrome*  
**MSG** – *Monosodium L-glutamate*  
**mTORC1** – *1c via mammalian target of rapamycin complex 1*  
**NAFLD** – *Nonalcoholic fatty liver disease*  
**NCD-RisC** – *Non-Communicable Diseases Risk Collaboration*  
**NTS** – Núcleo trato solitário  
**NASH** – *Nonalcoholic steatohepatitis*  
**NAD<sup>+</sup>** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
**OECD** – *Organisation for Economic Co-operation and Development*  
**OMS** – Organização mundial de saúde  
**PEP** - Fosfoenolpiruvato.  
**PKCε** – Proteína quinase Cε

**PI3K** – *Phosphatidylinositol-3 kinase*

**PPAR- $\alpha$**  – *Peroxisome-activated receptor alpha*

**PPAR- $\gamma$**  – *Peroxisome-activated receptor gamma*

**PYY** – Peptídeo intestinal YY

**RE** – Retículo endoplasmático

**RENISUS** - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS

**RI** – Resistência insulínica

**SCFA** – *Short chain fatty acid*

**SM** – Síndrome metabólica

**SMCT1** - Sodium-dependent monocarboxylate transporter 1

**SOD** – Superóxido dismutase

**SREBP1c** – Elemento regulador de esterol 1c

**STZ** – Estreptozotocina

**SUS** – Sistema único de saúde

**SYZ** – *Sizygium cumini*

**TAB** – Tecido adiposo branco

**TBARS** – Ácido tiobarbitúrico

**TG** – Triglicerídeos

**TNF- $\alpha$**  – *Tumor necrosis factor alpha*

**T2DM** – *Type 2 diabetes*

**VIGITEL** – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

**VLDL** – *Very low density lipoprotein*

**WHO** – World health organization

## LISTA DE FIGURAS

### Referencial teórico:

**Figura 1: Papel da sensibilidade insulínica na fisiopatologia da síndrome metabólica.** Em condições normais (sensibilidade à insulina), logo após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos ocorre o aumento de glicose no plasma estimulando a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. Este hormônio irá atuar nos tecidos para promover o estoque de calorias provenientes da dieta. No músculo esquelético, a insulina aumenta a captação de glicose, conseqüentemente, a síntese de glicogênio. No fígado, a insulina inibe a gliconeogênese e estimula tanto a síntese de glicogênio e como a lipogênese *de novo* (LDN). No tecido adiposo branco (TAB), ela suprime a lipólise e promove a lipogênese. Na condição de síndrome metabólica o acúmulo ectópico de lipídio prejudica a sinalização insulínica. Portanto, diminui a captação de glicose pelo músculo e, também, a síntese de glicogênio nas células desse tecido. No fígado, a insulina perde a capacidade de inibir a gliconeogênese e ativar a síntese de glicogênio. Além disso, induz mais LDN com conseqüente desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). No TAB insensível a insulina, ocorre o aumento da lipólise, levando ao aumento da liberação de ácidos graxos livres na circulação, favorecendo o acúmulo de lipídeos no miócitos (IMCL) e manutenção da DHGNA. Dessa forma, a resistência insulínica periférica é exacerbada o que acabada contribuindo para a deficiência da secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas promovendo, então, a hiperglicemia. Figura adaptada de Samuel & Shulman, 2012.

**Figura 2: A relação entre acetilação de proteínas e metabolismo.** O metabolismo pode influenciar a acetilação de proteínas através de mudanças na concentração intracelular de  $\text{NAD}^+$  e acetil-coenzima A (acetil-CoA). Por exemplo, a concentração relativa de  $\text{NAD}^+$  aumenta, levando ao aumento da atividade enzimática de sirtuínas e a deacetilação de seus alvos. A atividade de acetiltransferases varia de acordo com a concentração de acetil-CoA. Quando houver aumento da carga de nutrientes e a concentração de acetil-CoA aumentar, o aumento da atividade da acetiltransferase promoverá a acetilação de proteínas alvo. Fonte: Verdin & Ott (2014) com modificações.

**Figura 3: Vias responsáveis pela biossíntese dos principais metabólitos microbianos resultantes da fermentação de carboidratos.** O acetato, um dos três principais ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, mostrado em vermelho), pode ser produzido por muitas bactérias entéricas a partir do piruvato, via acetil-CoA e pela via Wood-Ljungdahl. O butirato é formado a partir de duas moléculas de acetil-CoA por vários Firmicutes ou a partir do acetato pela ação da butiril-CoA:acetato-CoA-transferase, geralmente usada para catalisar este último passo. A principal via de produção do propionato é pela via do succinato, geralmente usada por Bacteroidetes para gerar propionato de carboidratos e por alguns Firmicutes que produzem propionato a partir do lactato ou succinato. Duas outras vias de produção de propionato são encontradas em algumas bactérias do intestino: a via do acrilato, que usa lactato, e a via do propanodiol, que usa fucose e rhamnose. Arqueas são mostradas em laranja. Bacteroidetes em cinza. Lachnospiraceae (Firmicutes) em azul. Ruminococcaceae (Firmicutes) em roxo. Negativicutes (Firmicutes) em verde e Proteobacteria em marron. DHAP, dihidróxiacetonafofato; PEP, fosfoenolpiruvato. Fonte: Louis et al. (2014) com modificações.

**Figura 4: A microbiota intestinal está envolvida no início de distúrbios metabólicos associados com a obesidade:** a dieta está associada a disbiose da microbiota intestinal que promove alterações na permeabilidade intestinal (alterando a distribuição das proteínas *tight junction*) e, dessa forma, produtos bacterianos como o LPS chegam a circulação sanguínea provocando a endotemia metabólica, iniciando os processos de inflamação crônica sub-clínica, resistência insulínica nos tecidos adiposo, muscular e fígado com conseqüente desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 e doença hepática gordurosa não-alcoólica. Figura adaptada de Cani & Delzenne, 2011.

**Figura 5: Relação entre os polifenóis e a microbiota intestinal:** Está bem estabelecido que a biodisponibilidade dos polifenóis depende da sua metabolização por enzimas hidrolíticas presentes no epitélio intestinal e em grande parte pela microbiota intestinal. Após serem ingeridos, os polifenóis podem: (1) - exercer efeitos diretos no trato gastrointestinal associado, por exemplo, ao seu potencial antioxidante; ou atuar de maneira sistêmica induzindo a liberação de hormônios associados a homeostase de glicose pelas células enteroendócrinas. (2) - podem interagir com a microbiota promovendo alterações na sua composição, por exemplo, favorecendo o crescimento de bactérias benéficas; ou biotransformados pela microbiota, gerando assim moléculas menores mais

facilmente absorvidas e, portanto, chegando até aos órgãos distais. Promovem também efeitos sistêmicos, pela indução da liberação de hormônios intestinais pelas células enteroendócrinas. (3) - podem ser metabolizados pelas células do epitélio intestinal e de lá podem chegar a circulação ou serem excretados de volta ao lúmen do intestino. Assim, o metabolismo dos polifenóis no trato gastrointestinal, principalmente, pela microbiota intestinal é de extrema importância para os efeitos benéficos promovidos por esses compostos ao metabolismo do hospedeiro. Figura adaptada de Oteiza et al., 2018.

**Figura 6:** *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **A.** Imagem de um espécime no campus Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA. **B.** Detalhes da folha e frutos da espécie. Fonte: própria

**Figura 7: Compostos polifenóis identificados no *Syzygium cumini* e seus possíveis mecanismos de ação sobre a síndrome metabólica.** A quercetina e rutina podem diminuir a hiperglicemia pelo estímulo da secreção de insulina através do bloqueio de canais de  $Ca^{2+}$  tipo L nas células- $\beta$  pancreáticas. Além disso, a rutina contribui através da inibição da produção hepática de glicose por aumentar a atividade da hexoquinase e diminuir a frutose-1,6-bifosfatase no fígado. A miricetina melhora a sensibilidade insulínica periférica por aumentar a expressão de GLUT-4 no tecido adiposo branco. Ácido gálico, quercetina e rutina diminuem a síntese de colesterol por inibirem a HMG-CoA redutase hepática. Além desses efeitos, a atividade antioxidante característica desses compostos e do *S. cumini* pode ser determinante para melhora das alterações glicêmicas e lipídicas observada na síndrome metabólica. Fonte: Chagas et al. (2015) com modificações.

## Capítulo I:

**Figure 1. Polyphenols – gut microbiota interaction and its impact on host metabolism.** Polyphenols are secondary metabolites widely distributed in fruits, vegetables and other plant-based foods in glycosylated form. At the colon, polyphenols not absorbed in the small intestine are catabolized by distinct bacteria phyla pertaining to gut microbiota. Those bacteria deglycosylate complex polyphenols to deliver bioactive compounds, which modulate the microbiota by inhibiting harmful and stimulating beneficial bacteria through the biosynthesis of microbial metabolites, such as the short chain fatty acids (SCFA). Acetate, propionate and butyrate are the most abundant SCFA at human distal colon, where they are rapidly absorbed by colonic cells via monocarboxylate transporters (MCT1 and SMCT1), passive diffusion or ion-exchange with bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ). Once in the interstitial fluid, SCFA bind to GPR41 and GPR43 receptors, leading to the secretion of the gut-derived satiety hormones PYY and GLP-1, whereas smaller amounts reach the blood stream to promote metabolic effects on peripheral tissues, such as liver, adipose tissue, and skeletal muscles. Abbreviations: MCT1, monocarboxylate transporter 1; SMCT1, sodium-dependent monocarboxylate transporter 1; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GRP, G-protein coupled receptor; PYY, peptide YY.

## Capítulo II:

**Figura 1.** Parâmetros morfométricos durante o período de intervenção com a dieta. A. Peso dos animais em gramas (g). B. Consumo energético dos animais (g/100g/dia). c. Índice de Lee (IL) ( $g^{1/3}/cm^{-1} \times 1000$ ) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6) e com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8) durante 22 semanas após o desmame (21 dias). As barras representam média  $\pm$  epm. Teste *t* de Student não pareado.

**Figura 2.** Perfil bioquímico e resistência insulínica. Níveis glicêmicos séricos (mg/dL) em jejum (A) e pós-prandial (B). Níveis séricos de insulina ( $\mu$ IU/ml) (C). Índice TyG (D). Índice HOMA-IR (E). Níveis séricos de ácidos graxos livres (F) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6) e com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8) durante 22 semanas após o desmame (21 dias). As barras representam média  $\pm$  epm. Teste *t* de Student não pareado. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ .

**Figura 3.** Avaliação da microbiota intestinal. Alfa diversidade calculada pelo Índice de Shannon (A). Abundância relativa dos 25 gêneros mais abundantes (B). Análise das principais coordenadas (PCoA) usando o índice de dissimilaridade de Bray curtis ( $R^2 = 0.336$ ,  $p = 0.001$  by PERMANOVA) (C) ) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6) e com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8) após 22 semanas de intervenção.

**Figura 4.** Abundância relativa dos gêneros mais alterados pela dieta HSD (A). Concentração de AGCC nas fezes (B). Endotoxina sérica (C) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6) e com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8) após 22 semanas de intervenção. As barras representam média  $\pm$  epm. Teste *t* de Student não pareado. \*  $p < 0.05$  \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figura 5.** Análise histológica do fígado após o período de intervenção com a dieta. Secções de amostras de fígado coradas com Oil Red para a visualização de *droplets* de lipídios, morfologia de hepatócitos, score para esteatose, ballooning e inflamação avaliados em ratos do grupo CTR (n=6) e HSD (n=8) (A). Conteúdo de glicogênio hepático (B). Expressão proteica da Acot9(C) e avaliação da acetilação total de proteínas por Western blotting (D). Níveis hepático (E) e séricos (F) de triglicerídeos após 22 semanas de intervenção. As barras representam média  $\pm$  epm. Teste *t* de Student não pareado. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ .

### Capítulo III:

**Figura 1.** Parâmetros morfométricos durante o tratamento com o EH. A. Peso dos animais em gramas (g) durante o período de 5 semanas de tratamento com o EH. B. Consumo energético dos animais durante o tratamento com o EH. C. Índice de Lee (IL) ( $\text{g}^{1/3}/\text{cm}^{-1}$ ). One-way ANOVA (Newman Keuls). <sup>a</sup> (HSD + EH 0,50 vs CTR). <sup>b</sup> (HSD + EH 0,50 vs HSD). <sup>c</sup> (HSD + EH 0,50 vs HSD + EH 0,25).

**Figura 2.** Avaliação da resistência insulínica e perfil bioquímico. A. Níveis glicêmicos pré-prandiais durante o período de tratamento com o EH. B. Níveis de glicose durante o teste de tolerância a glicose (GTT). C. Área sob a curva (AUC) dos níveis de glicose no sangue durante o GTT. D. Níveis glicêmicos pós-prandiais durante o período de tratamento com o EH. E. Níveis de glicose no sangue durante o teste de tolerância a insulina (ITT). F. Área sob a curva (AUC) dos níveis de glicose no sangue durante o ITT. G. Índice TyG. H. HOMA1-IR. I. Níveis de insulina em jejum. J. Níveis séricos de triglicerídeos. K. Níveis séricos de colesterol avaliados em ratos CTR, HSD e tratados com o EH após o período de 5 semanas. Os valores representam média  $\pm$  epm. One-way ANOVA (Newman Keuls). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  comparado ao CTR, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparado ao HSD.

**Figura 3.** Análise histológica do fígado após o tratamento com o EH. Secções de amostras de fígado coradas com Oil Red para a visualização de *droplets* de lipídios, morfologia de hepatócitos, score para esteatose, ballooning e inflamação avaliados em ratos do grupo CTR (n=6), HSD (n=8), HSD+0,25EH (n=7) e HSD+0,50EH (n=7). Os valores representam média  $\pm$  epm. One-way ANOVA (Newman Keuls). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  comparado ao CTR, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparado ao HSD.

**Figura 4.** Avaliação de marcadores da sinalização insulínica hepática e do estresse do retículo endoplasmático. A. Nível de glicogênio hepático dos animais dos grupos controle (CTR), alimentados com dieta rica em sacarose (HSD) e tratados com o EH (HSD+0,25; HSD+0,50). B. Efeito do tratamento com o EH na expressão da AKT no fígado de animais dos grupos (CTR), alimentados com dieta rica em sacarose (HSD) e tratados com o EH (HSD+0,25; HSD+0,50). C. Efeito do tratamento com o EH na expressão da GRP78 no fígado de animais dos grupos (CTR), alimentados com dieta rica em sacarose (HSD) e tratados com o EH (HSD+0,25; HSD+0,50). As barras representam média  $\pm$  epm. One-way ANOVA (Newman Keuls). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  comparado ao CTR, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparado ao HSD.

**Figura 5.** Avaliação do efeito do EH sobre a microbiota intestinal. Abundância relativa dos 25 gêneros mais abundantes (A) Alfa diversidade calculada pelo Índice de Shannon (B). Análise das principais coordenadas (PCoA) usando o índice de dissimilaridade de Bray Curtis (C) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6), com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8), animais alimentados com a dieta rica em sacarose e tratados com o EH nas doses de 0,25g/Kg (HSD+0,25, n=7) e 0,50g/Kg (HSD+0,50, n=7) após o período de 5 semanas. A análise estatística para o cálculo da  $\beta$ -diversidade entre os grupos foi realizada pelo teste de Análise multivariada permutacional de variância não-paramétrico (PERMANOVA, 999 Monte Carlo permutations).

## **LISTA DE TABELAS**

### **Capítulo I:**

**Table 1.** Effect of isolated (poly)phenols on gut microbiota, short-chain fatty acids production and host metabolic outcomes.

### **Capítulo III:**

**Tabela 1.** Composição centesimal da dieta padrão e da dieta rica em sacarose



## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	22
<b>2 Referencial teórico</b> .....	26
2.1 Síndrome Metabólica: definição e epidemiologia .....	26
2.2 Fisiopatologia da Síndrome Metabólica .....	28
2.3 Açúcares de adição e a síndrome metabólica .....	32
2.4 O papel da microbiota intestinal na síndrome metabólica.....	36
2.5 Polifenóis e a modulação da microbiota intestinal .....	43
2.6 <i>Syzgium cumini (L) Skeels</i> e seu potencial para o tratamento da síndrome metabólica ...	47
<b>3 Objetivo</b> .....	56
3.1 Geral .....	55
3.2 Específicos .....	56
<b>4 Capítulo I - Artigo de revisão: Prebiotic effects of plant-derived (poly)phenols on host metabolism: Is there a role for short-chain fatty acids?.</b> .....	57
Abstract.....	58
1.Introduction .....	59
2. Development of gut microbiota .....	61
3. Dysbiosis and metabolic disorders.....	63
4 Short-chain fatty acids and their metabolic effects .....	64
5 Modulatory effects of plant-derived (poly)phenols on gut microbiota .....	68
6.Relationship between short-chain fatty acids profile and (poly)phenols metabolic effects ..	84
Closing remarks and perspectives .....	86
References .....	89
<b>5 Capítulo II – Exposição precoce a dieta rica em sacarose induz desordens metabólicas associadas com alterações na microbiota intestinal de ratos Wistar</b> .....	99
Resumo .....	100
<b>Introdução</b> .....	101
<b>Materiais e métodos</b> .....	104
Desenho experimental .....	104
Avaliação do perfil bioquímico sérico .....	105
Histologia e glicogênio hepático .....	106

Avaliação da acetilação proteica por <i>western blotting</i> .....	107
Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	107
Análise do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	108
Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).....	109
<b>Resultados</b> .....	110
<b>Discussão</b> .....	116
Referencias.....	127
<b>6 Capítulo III - Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Syzygium cumini</i> reverte a hipetrigliceridemia e a esteatose hepática de ratos alimentados com dieta rica em sacarose</b> .....	133
Resumo .....	134
<b>Introdução</b> .....	135
<b>Metodologia</b> .....	138
Material Botânico e Obtenção do Extrato Hidroalcoólico de <i>S. cumini</i> .....	138
Dieta rica em sacarose .....	138
Indução da Obesidade e Tratamento Crônico com o EH .....	139
Testes de tolerância a glicose (GTT) e insulina (ITT) e índice TyG.....	140
Avaliações Séricas.....	140
Coleta e análise morfométrica .....	141
Histologia e glicogênio hepático .....	141
Expressão proteica por <i>western blotting</i> .....	142
Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA para avaliação da microbiota intestinal .....	143
Análise do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	143
Análise estatística .....	144
<b>Resultados</b> .....	145
Evolução ponderal e consumo energético dos animais ao final do tratamento com o EH ....	145
O tratamento com o EH melhora o perfil glico-lipídico dos animais HSD .....	146
O tratamento com o EH reverte a esteatose hepática dos animais HSD.....	148
O tratamento com o EH melhora o conteúdo hepático de glicogênio e promove o aumento da expressão proteica da AKT e GRP78 no fígado.....	150
O EH não afeta a diversidade microbiana de animais HSD .....	151
<b>Discussão</b> .....	154
<b>Conclusão</b> .....	162

<b>Considerações finais</b> .....	163
<b>Referências</b> .....	164
<b>Referencias do referencial teórico</b> .....	188
<b>ANEXO A</b> .....	

## RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada pela coexistência de três ou mais fatores de risco, dentre os principais podemos citar: obesidade abdominal, disglícemia, hipertensão, resistência à insulina e dislipidemia. A microbiota intestinal vem sendo amplamente investigada na última década devido a sua interação com muitas vias metabólicas do hospedeiro podendo ser um fator contribuinte de muitas desordens metabólicas. Estudos mostram que dietas suplementadas com polifenóis podem exercer ação moduladora sobre a microbiota intestinal. A espécie vegetal *Syzygium cumini* (SYZ) é amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de desordens metabólicas. Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a influência do extrato hidroalcoólico (EH) rico em polifenóis de SYZ sobre o eixo intestino-fígado através da modulação da microbiota intestinal e dos efeitos sobre o metabolismo hepático de animais alimentados com dieta rica em sacarose. O capítulo 1 desta tese refere-se a um estudo de revisão sobre a possível associação entre a modulação da microbiota pelos polifenóis e a promoção de efeitos benéficos ao hospedeiro através da maior produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). No capítulo 2 são apresentados os resultados da investigação sobre o efeito da sacarose no metabolismo glico-lipídico e na microbiota intestinal de ratos alimentados com dieta rica em sacarose após o desmame. Ratos *Wistar* foram alimentados com dieta padrão (CTR; n = 6) ou rica em sacarose (HSD; n = 8) por 22 semanas. Os animais HSD apresentaram aumento de TyG (13,2%), HOMA-IR (180%) e insulina sérica (180%). Além disso, eles também apresentaram intolerância à glicose e à insulina. Em relação aos lipídios séricos, o grupo HSD apresentou aumento dos níveis séricos de TG (134,9%) e AGL (42%) quando comparados aos animais CTR. Esse dado é corroborado pela presença de esteatose no fígado desses animais. A dieta rica em sacarose modificou a composição da microbiota intestinal de animais HSD, particularmente associada a espécies do filo Firmicutes que foi associado a um aumento de AGCC, principalmente o acetato. Nossos dados mostram que a dieta HSD foi capaz de modificar a composição da microbiota intestinal, reduzindo a diversidade bacteriana e favorecendo o crescimento de espécies produtoras de AGCC, promovendo alterações metabólicas significativas no eixo intestino-fígado dos animais. No capítulo 3 são apresentados os resultados da investigação acerca do efeito do EH sobre o metabolismo glico-lipídico de ratos alimentados com dieta HSD em um modelo experimental de SM que mais se assemelham aos humanos. Para isso, também foram utilizados ratos *Wistar* CTR e HSD. Os animais HSD foram divididos em 3 grupos: HSD tratado (v.o) com EH nas doses de 0,25 g/Kg ou 0,5 g/Kg (por 5 semanas) e HSD não tratado. O tratamento com o EH nas duas doses, reduziu a GL em jejum do grupo HSD quando comparados aos animais não tratados. Esse efeito foi corroborado com reduções do TyG e atenuações das intolerâncias à GL e insulina nos animais tratados com EH. A melhora na sensibilidade a insulina foi corroborada pelo aumento do conteúdo de glicogênio hepático nos animais tratados. O EH foi capaz de diminuir em torno de 40% os TG, nas duas doses avaliadas, e de reverter a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). Porém, o EH não foi capaz de modular a microbiota intestinal modificada pela dieta rica em sacarose. Dessa forma, confirma-se o uso tradicional dessa planta no controle da homeostase glicêmica e, pela primeira vez, a capacidade do EH na reversão da hipertrigliceridemia e esteatose hepática em um modelo de SM semelhante a humana. Entretanto, o mecanismo pelo qual o EH melhora esses parâmetros metabólicos não envolve a modulação da microbiota intestinal.

**Palavras-chave:** microbiota intestinal; dieta rica em sacarose; hipertrigliceridemia; polifenóis; *Syzygium cumini*.

## ABSTRACT

Metabolic syndrome (MetS) is characterized by the coexistence of three or more risk factors, among the main ones we can mention: abdominal obesity, dysglycemia, hypertension, insulin resistance and dyslipidemia. The gut microbiota has been extensively investigated in the last decade due to its interaction with many metabolic pathways of the host and may be a contributing factor to many metabolic disorders. Studies show that diets supplemented with polyphenols can exert a modulating action on the gut microbiota. The *Syzygium cumini* (SYZ) is widely used in traditional medicine to treat metabolic disorders. Therefore, the objective of our work was to evaluate the ability of the hydroalcoholic extract (EH) rich in SYZ polyphenols to modulate the gut microbiota and its possible influence on the gut-liver axis of animals fed a high-sucrose diet. Chapter 1 of this thesis refers to a review study on the possible association between the modulation of the microbiota by polyphenols and the promotion of beneficial effects to the host through the greater production of short-chain fatty acids (SCFA). Chapter 2 presents the results of research on the effect of sucrose on glyco-lipid metabolism and on the intestinal microbiota of rats fed a high-sucrose diet after weaning. *Wistar* rats were fed a standard diet (CTR; n = 6) or high sucrose (HSD; n = 8) for 22 weeks. HSD animals showed an increase in TyG (13.2%), HOMA-IR (180%) and serum insulin (180%). In addition, they also showed glucose and insulin intolerance. Regarding serum lipids, the HSD group showed an increase in serum levels of TG (134.9%) and AGL (42%) when compared to CTR animals. This data is corroborated by the presence of steatosis in the liver of these animals. The high-sucrose diet modified the composition of the intestinal microbiota of HSD animals, particularly associated with species of the Firmicutes phylum, which was associated with an increase in SCFA, mainly acetate. Our data show that the HSD diet was able to modify the composition of the gut microbiota, reducing bacterial diversity and favoring the growth of SCFA-producing species, promoting significant metabolic changes in the gut-liver axis of animals. Chapter 3 presents the results of research on the effect of EH on the glyco-lipid metabolism of rats fed an HSD diet in an experimental model of MetS that most resembles humans. For this, *Wistar* rats were fed standard diets (CTR) or high in sucrose (HSD) for 17 weeks. After this period, the HSD animals were divided into 3 groups: HSD treated (v.o) with EH at doses of 0.25 g / Kg or 0.5 g / Kg (for 5 weeks) and untreated HSD. The treatment with HE in both doses reduced the fasting GL of the HSD group when compared to untreated animals. This effect was corroborated with reductions in TyG and attenuation of intolerances to GL and insulin in animals treated with HE. The improvement in insulin sensitivity was corroborated by the increase in the hepatic glycogen content in the treated animals. EH was able to decrease TG around 40%, in the two doses evaluated, and to reverse non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). However, EH was not able to modulate the intestinal microbiota, which was totally modified by the high-sucrose diet. Thus, the traditional use of this plant in the control of glycemic homeostasis and, for the first time, the ability of HE to reverse hypertriglyceridemia and hepatic steatosis in a human-like MetS model are confirmed. However, the mechanism by which EH improves these metabolic parameters does not involve modulation of the gut microbiota.

**Key words:** gut microbiota; high-sucrose diet; hypertriglyceridemia; polyphenols; *Syzygium cumini*.

## 1 Introdução

A síndrome metabólica (SM) é uma definição clínica que engloba um conjunto de fatores de risco metabólicos que predisõem os indivíduos ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (Finicelli et al. 2019). Dentre os fatores de risco podemos citar: obesidade abdominal, disglícemia, hipertensão, resistência à insulina e dislipidemia. A SM é caracterizada pela coexistência de pelo menos três desses fatores (Alberti et al. 2009). Apesar de sua maior incidência em países industrializados, a SM tem aumentado em outras regiões, por exemplo, no sudeste asiático (Rochlani et al. 2017). De acordo com o International Diabetes Federation (IDF), é estimado que 25% da população mundial apresente SM, sendo a população dos Estados Unidos a mais afetada, e, em seguida, a população europeia. Dessa forma, a SM vem sendo tratada como um desafio urgente para a saúde humana, por trazer graves implicações aos sistemas nacionais de saúde (Nolan et al. 2017). No Brasil, não existe dados sobre a porcentagem de indivíduos com SM, embora podemos estimar uma alta prevalência uma vez que o último inquérito domiciliar realizado demonstrou que 55,4% dos indivíduos adultos estavam com sobrepeso. Desses, 20,3% estavam obesos, sem diferenças entre os sexos (VIGITEL 2019).

A resistência insulínica (RI) e a hiperinsulinemia são fortes preditores para o DM2 e são decorrentes da insensibilidade à insulina nos principais tecidos metabólicos (tecido adiposo, músculo esquelético e fígado). O acúmulo de triglicérides (TG) no tecido adiposo branco (TAB) contribui para o surgimento de inflamação crônica local e, conseqüente, aumento de citocinas pró-inflamatórias. A presença dessas citocinas associadas ao estresse oxidativo, interfere na sinalização insulínica no TAB resultando em um quadro de resistência insulínica (RI) (Heymsfield and Wadden 2017a). Como conseqüências da RI tem-se a maior liberação de ácidos graxos livres (AGL) pelo TAB e estímulo da lipogênese no fígado, o que favorece o aparecimento das dislipidemias (Taskinen and Borén 2015). A disfunção do adipócito estimula

o fígado a sintetizar mais TG, tanto pela maior captação de AGL da circulação, como pela síntese *de novo* de lipídios em consequência da hiperinsulinemia provocada pela RI. Como resultado do maior acúmulo de gordura hepática, o fígado exportará maiores quantidades de TG na forma de *very low density lipoprotein* (VLDL), contribuindo, dessa forma, tanto para o desenvolvimento da esteatose hepática não-alcoólica (EHNA) como da hipertrigliceridemia (Eslamparast, Tandon, and Raman 2017).

Muitos estudos têm demonstrado que o elevado consumo de açúcares de adição está associado com o desenvolvimento da SM. Esses açúcares adicionados aos alimentos contribuem para o rápido aumento dos níveis séricos de glicose e insulina, que está associado à resistência insulínica e a SM (Zhang et al. 2018). Particularmente, sacarose e frutose, estão associados ao aumento dos níveis de triglicerídeos na circulação, promovendo assim, o aumento da lipogênese *de novo* hepática e a diminuição da sensibilidade a insulina no fígado, como também podem contribuir para o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) (Hannou et al. 2018). Dietas ricas em açúcar podem modificar a composição da microbiota intestinal, reduzindo especificamente a diversidade bacteriana e favorecendo o aumento da abundância de grupos específicos associados ao desenvolvimento de desordens metabólicas (de Oliveira Neves et al. 2020). Além disso, dietas com excesso de açúcar podem causar danos ao epitélio intestinal, aumentando a permeabilidade do mesmo, favorecendo assim, a endotoxemia metabólica e a esteatose hepática (Satokari 2020).

Atualmente, existem fortes evidências de que a inflamação crônica sub-clínica, processo importante para o desenvolvimento de desordens metabólicas como a SM, é decorrente da interação entre a dieta do indivíduo e sua microbiota intestinal (Cani et al. 2012). Além do tecido adiposo, estudos demonstraram que o intestino é uma fonte importante de mediadores inflamatórios que interferem na sinalização insulínica, promovendo a RI (Ding et al. 2010; Ding and Lund 2011; Lam et al. 2012). Camundongos *germ free* (GF) geralmente não

desenvolvem obesidade, RI e inflamação intestinal induzida por dieta rica em gordura. No entanto, quando esses camundongos foram colonizados com a microbiota de animais obesos, desenvolveram o mesmo perfil associado a SM dos doadores (Bäckhed et al. 2004; Turnbaugh et al. 2006).

O microbioma intestinal corresponde a uma complexa comunidade de microrganismos (bactérias, fungos e vírus) residentes em nosso intestino (Cani 2018). Alterações na composição e abundância de filos dominantes na microbiota intestinal tem sido associada com a obesidade (Ley, Bäckhed, et al. 2005; Ley et al. 2006; Turnbaugh et al. 2006; Turnbaugh et al. 2007). A SM resultante da obesidade tem sido associada a endotoxemia metabólica, processo definido pela elevada concentração de LPS na circulação derivado da microbiota intestinal (Cani et al. 2007; Moreira et al. 2012). O LPS pode, assim, contribuir para o desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos, resistência insulínica, diabetes e doença hepática gordurosa não-alcoólica (Jayakumar and Loomba 2019; Sharma and Tripathi 2019).

Estratégias usadas em todo o mundo para o manejo e tratamento da SM, estão direcionadas, principalmente, para a combinação de mudanças no estilo de vida e intervenção farmacológica. Porém, essa estratégia não tem sido eficaz na redução da prevalência da SM (Finicelli et al. 2019). Nesse contexto, surge a necessidade da busca por novas abordagens. Entre elas, o uso de fármacos derivados de plantas se apresentam como fonte de compostos bioativos e, portanto, com potencial terapêutico para atuar em diferentes vias metabólicas e também na modulação da microbiota intestinal, visando efeitos benéficos a saúde do hospedeiro (Li, Watanabe, and Kimura 2017).

Estudos com polifenóis vem demonstrando a importância desses compostos na prevenção e tratamento da SM, seja através da participação em mecanismos bioquímicos e moleculares, atuando em vias de sinalização intra e intercelulares (Kim, Quon, and Kim 2014; Fraga, Oteiza, and Galleano 2018) ou atuando na modulação da microbiota intestinal (Queipo-



Ortuño et al. 2012; Etxeberria et al. 2015; Lin et al. 2019). Estes compostos são um grupo heterogêneo de moléculas presentes em plantas e abundantes na alimentação humana que podem promover benefícios a saúde, particularmente associados a prevenção de doenças crônicas, tendo sua ação antioxidante como principal propriedade (Tsao 2010). Além disso, comprovadamente modulam a microbiota intestinal inibindo o crescimento de bactérias nocivas (Duda-Chodak et al. 2015) e favorecendo o crescimento de bactérias benéficas que contribuem para a redução da permeabilidade intestinal como também ajudam na prevenção e tratamento da obesidade (Neyrinck et al. 2013; Lin et al. 2019).

*Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) se destaca por ser amplamente usada na medicina tradicional para o tratamento de várias patologias, principalmente o diabetes (Ayyanar and Subash-Babu 2012). Por essas propriedades, essa espécie foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL and Saúde 2009). Como demonstrado por Chagas et al. (2015), há vários compostos fenólicos identificados no *S. cumini* que podem atuar melhorando distúrbios metabólicos como a hiperglicemia (Sharma, Balomajumder, and Roy 2008b; Sharma et al. 2008; Schoenfelder et al. 2010; Ramya, Neethirajan, and Jayakumararaj 2012; Silva et al. 2012; Tripathi and Kohli 2014), resistência insulínica (Sharma, Balomajumder, and Roy 2008b; Sharma et al. 2008; Ulla et al. 2017), hipertrigliceridemia (Ravi, Rajasekaran, and Subramanian 2005a; Sharma et al. 2008; Schoenfelder et al. 2010; Patel, Shah, and Goyal 2009; Sanches et al. 2016; França et al. 2019), esteatose hepática (Sanches et al. 2016; Ulla et al. 2017; França et al. 2019), além de atuar como antioxidante (Arun et al. 2011a; Aqil et al. 2012; Tripathi et al. 2013; Sanches et al. 2016; Ulla et al. 2017).

Alguns estudos com extratos ricos em polifenóis demonstraram a capacidade destes em modular a microbiota intestinal de animais alimentados tanto com dieta rica em gordura quanto em açúcar (Anhe et al. 2015; Henning et al. 2018; Wang, Tang, et al. 2018). Resultado

semelhante foi observado em estudo com humanos (Moreno-Indias, Sanchez-Alcoholado, et al. 2016). A modulação da microbiota intestinal foi associada com a redução da inflamação sistêmica e aumento da sensibilidade insulínica hepática (Anhe et al. 2015; Lee et al. 2018), além da redução da esteatose hepática (Anhê et al. 2018; Lee et al. 2018).

Apesar de haver alguns estudos que indiquem por quais mecanismos hepáticos ou adipocitários o extrato hidroalcoólico (EH) de *S.cumini* possa estar agindo (Sharma, Balomajumder, and Roy 2008b), há uma grande probabilidade de que sua atuação possa ser pela modulação da microbiota intestinal, uma vez que o extrato tem uma grande presença de compostos fenólicos, os quais possuem essa propriedade, já evidenciada em experimentos com extratos ricos em polifenóis, descritos acima. Portanto, visto que não existe estudos avaliando o efeito do extrato de *S. cumini* sobre a composição da microbiota intestinal, hipotetizamos que o EH é capaz de alterar a composição da microbiota intestinal modulando o eixo intestino-fígado de animais alimentados com dieta rica em sacarose.

## **2 Referencial teórico**

### **2.1 Síndrome Metabólica: definição e epidemiologia**

A síndrome metabólica (SM) foi inicialmente descrita em 1988 (Reaven 1988), sendo caracterizada pela coexistência de três ou mais fatores de risco, dentre os principais podemos citar: obesidade abdominal, disglicemia, hipertensão, resistência à insulina e dislipidemia (Alberti et al. 2009). A prevalência global de SM varia de acordo com fatores geográficos e dados sócio-demográficos, bem como o critério usado para diagnóstico. Segundo dados de uma pesquisa realizada em 2015 (National Health and Nutrition Examination Survey), 35% dos adultos nos Estados Unidos (EUA) tinham diagnóstico de SM (30,3% em homens e 35,6% em mulheres) (Aguilar et al. 2015). Em pesquisa anterior, foi observada uma prevalência de SM

entre mulheres afro-americanas de 57% e de 26% entre mulheres hispânicas (Grundy 2008). Entre adolescentes americanos foi estimada uma prevalência de 10,1% (Miller et al. 2014). Estima-se que muitos indivíduos com SM sejam assintomáticos, mas com um risco considerado elevado para a ocorrência de um primeiro evento coronariano dentro de um período de 10 anos. Atualmente, existe um sub-diagnóstico e sub-tratamento da SM (Aguilar et al. 2015).

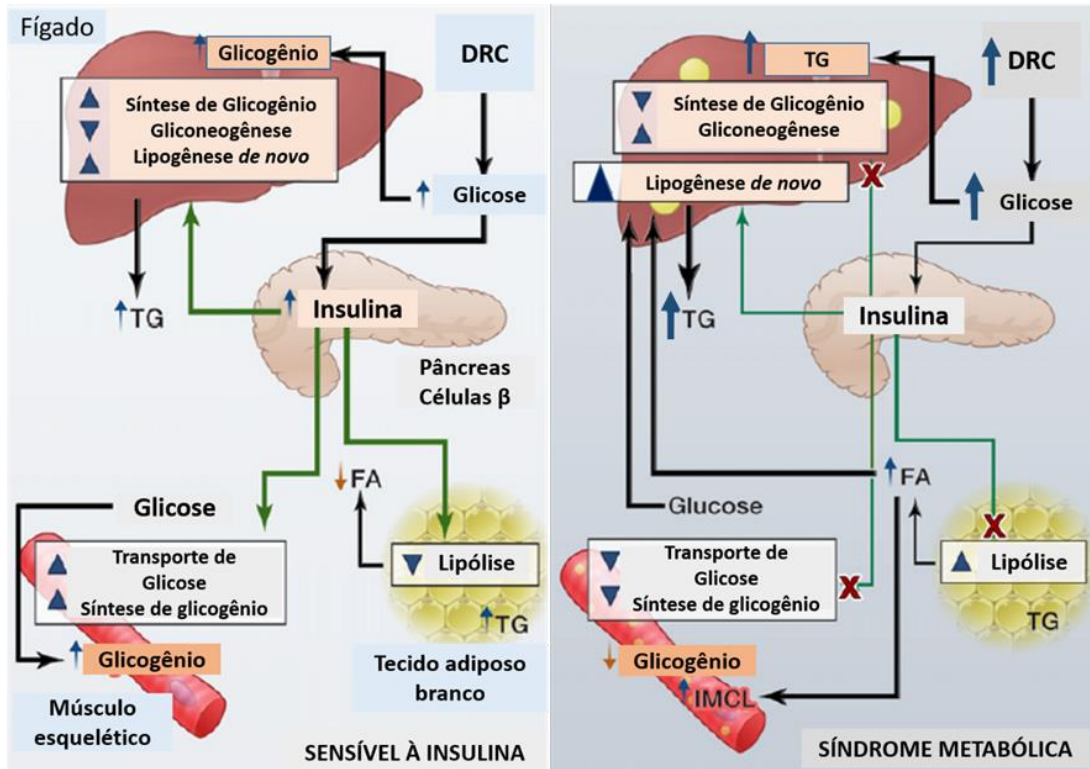
A prevalência de SM geralmente corresponde a prevalência de obesidade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define obesidade como o acúmulo excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde e tem seu diagnóstico baseado no valor do Índice de Massa Corpórea (IMC)  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  (WHO, 2000). A prevalência de IMC  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  varia de 3,7% no Japão a 38,2% nos EUA (OECD, 2017). De maneira alarmante, a prevalência de obesidade aumentou em todo o mundo entre 1975 e 2016. Entre crianças e adolescentes, o aumento foi de 0,7% para 5,6% em meninos e de 0,9% para 7,8% em meninas ("Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults" 2017). Entre adultos, no mesmo período, foi de 3,2% para 10,8% em homens e de 6,4% para 14,9% em mulheres. Em 2014, 0,64% de homens e 1,6% de mulheres apresentavam obesidade mórbida (IMC  $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) ("Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants" 2016). No Brasil, de acordo com a última pesquisa realizada por inquérito telefônico pelo Ministério da saúde (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico-VIGITEL), revelou que 55,4% dos indivíduos adultos estavam com sobrepeso. Desses, 20,3% estavam obesos, sem diferenças entre os sexos (VIGITEL 2019).

A obesidade aumenta o risco para doenças metabólicas (diabetes mellitus tipo 2 e a doença gordurosa hepática), doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, depressão e

alguns tipos de câncer. Além disso, a obesidade pode provocar a redução da qualidade de vida, desemprego e baixa produtividade (Blüher 2019).

## **2.2 Fisiopatologia da Síndrome Metabólica**

A ampla variação na distribuição geográfica da síndrome metabólica (SM) enfatiza a importância de fatores ambientais e estilo de vida no desenvolvimento desta patogênese, como, por exemplo, o consumo excessivo de alimentos altamente calóricos e a ausência de atividade física. O aumento da adiposidade tem se apresentado como o principal fator causal para o desenvolvimento das principais vias envolvidas na determinação do quadro da SM. Por isso, dentre os mecanismos fisiopatológicos da SM destaca-se a resistência insulínica no tecido adiposo branco e a, conseqüente, maior liberação de ácidos graxos livres para circulação (**Figura 1**). Além disso, o maior consumo de dietas ricas em carboidratos (DRC) estimula a maior síntese de lipídeos e reduz o conteúdo de glicogênio no músculo esquelético e fígado, o que contribui para instalação de uma resistência insulínica sistêmica e, conseqüentemente, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e esteatose hepática (**Figura 1**) (Samuel and Shulman 2012).



**Figura 1. Papel da sensibilidade insulínica na fisiopatologia da síndrome metabólica.** Em condições normais (sensibilidade à insulina), logo após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos ocorre o aumento de glicose no plasma estimulando a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. Este hormônio irá atuar nos tecidos para promover o estoque de calorías provenientes da dieta. No músculo esquelético, a insulina aumenta a captação de glicosee, conseqüentemente, a síntese de glicogênio. No fígado, a insulina inibe a gliconeogênese e estimula tanto a síntese de glicogênio e como a lipogênese *de novo* (LDN). No tecido adiposo branco (TAB), ela suprime a lipólise e promove a lipogênese. Na condição de síndrome metabólica o acúmulo ectópico de lipídio prejudica a sinalização insulínica. Portanto, diminui a captação de glicose pelo músculo e, também, a síntese de glicogênio nas células desse tecido. No fígado, a insulina perde a capacidade de inibir a gliconeogênese e ativar a síntese de glicogênio. Além disso, induz mais LDN com conseqüente desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). No TAB insensível a insulina, ocorre o aumento da lipólise, levando ao aumento da liberação de ácidos graxos livres na circulação, favorecendo o acúmulo de lipídeos no miócitos (IMCL) e manutenção da DHGNA. Dessa forma, a resistência insulínica periférica é exacerbada o que acaba contribuindo para a deficiência da secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas promovendo, então, a hiperglicemia. Figura adaptada de Samuel & Shulman, 2012.

A sinalização insulínica participa do controle de várias funções celulares como proliferação, crescimento e morte celular, além das sínteses de proteínas, glicose e lipídios (Riehle and Abel 2016). Para que essa sinalização ocorra de forma satisfatória é necessário que esse hormônio desencadeie fosforilações sucessivas em resíduos de tirosina em seu receptor. A subunidade catalítica da fosfoinositol-3-quinase (PI3K) desencadeia uma nova sequência de reações de fosforilação que tem como alvo principal a ativação da proteína quinase B ou Akt. Uma vez ativada, a Akt pode fosforilar e inativar a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3)

permitindo a síntese de glicogênio (Roberts, Hevener, and Barnard 2013). No tecido adiposo, a ativação da PI3K/Akt promove a supressão da lipólise (Choi et al. 2010). A captação celular de glicose dependente de insulina é estimulada pela migração da proteína transportadora de glicose (GLUT4) para a membrana celular e, conseqüente, transporte de glicose para dentro da célula. Além de promover o estoque de glicose, a insulina inibe a gliconeogênese e a glicogenólise, como também estimula a transcrição de genes codificantes de enzimas envolvidas nas vias glicolíticas e síntese de ácidos graxos. No fígado, a insulina inibe a transcrição e atividade de enzimas envolvidas na gliconeogênese (McCracken, Monaghan, and Sreenivasan 2018).

Entretanto, a ingestão em excesso de nutrientes como gorduras e açúcares simples induzem a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio em vários tecidos, o que ativa quinases de serina e treonina, favorecendo a maior fosforilação desses aminoácidos no receptor de insulina e em seus substratos, o que contribui para desenvolvimento do quadro de resistência insulínica (RI) (Evans et al. 2005). A redução da sensibilidade à insulina em tecidos alvos a ação desse hormônio, é um fator chave para o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Logo no início, as células  $\beta$  do pâncreas aumentam a quantidade de insulina secretada na circulação como um mecanismo de compensação para a manutenção da homeostase de glicose. Porém, a hiperinsulinemia promove maior acúmulo de gordura no fígado e, conseqüente, hipertrigliceridemia (Czech 2017).

O tecido adiposo possui um papel central na patofisiologia da SM. Os adipócitos constituintes do tecido adiposo branco (TAB) são os principais responsáveis pelo estoque de triglicerídeos. Dessa forma, podem sofrer hipertrofia e hiperplasia em resposta ao excesso de nutrientes, o que pode resultar em déficit no suprimento de sangue com a indução de um estado de hipóxia, o que leva a uma disfunção dos adipócitos (Halberg, Wernstedt-Asterholm, and Scherer 2008). Nessa condição, há maior secreção de adipocinas pró-inflamatórias por essas células (IL-6, TNF- $\alpha$ ), resultando em um estado inflamatório crônico sub-clínico ao nível

sistêmico. A hidrólise de triglicerídeos dentro do adipócito promove a liberação de ácidos graxos livres (AGL). Portanto, elevados níveis de AGL, citocinas inflamatórias e intermediários de lipídios interferem na sinalização insulínica, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento da RI nesse tecido (Tchkonina et al. 2013).

A concentração dos AGL na circulação é regulada principalmente pela ação da insulina no TAB através da supressão da atividade lipolítica nos adipócitos. Assim, no quadro de RI há aumento da liberação dos AGL pelo TAB (McCracken, Monaghan, and Sreenivasan 2018). Com o maior influxo de AGL nos tecidos, há o acúmulo de gordura fora do tecido adiposo (gordura ectópica), como no músculo esquelético e fígado, o que favorece a produção de intermediários da  $\beta$ -oxidação lipídica como os diacilgliceróis (DAG) e ceramidas (Samuel and Shulman 2012). Esses lipídeos aumentam a atividade das PKCs, o que diminui a fosforilação dos resíduos de tirosina no receptor de insulina, contribuindo ainda mais para o quadro de RI sistêmico (Freidenberg et al. 1988; Petersen and Shulman 2018). O fígado tem papel essencial na manutenção da homeostase de lipídios e balanço energético através de múltiplas vias metabólicas como, por exemplo, a lipogênese de novo (LDN), captação de ácidos graxos, oxidação de ácidos graxos e exportação de triglicerídeos. Ocorre então, uma coordenada supressão da gliconeogênese e da glicogenólise, com ativação da síntese de glicogênio (Petersen and Shulman 2018). A sinalização insulínica através da Akt no fígado ativa a síntese de ácidos graxos a partir da glicose e aminoácidos, via da LDN, que culmina com o empacotamento de triglicerídeos (TG) em vesículas de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) para exportação e captação pelos tecidos periféricos (Biddinger et al. 2008). Porém, sob condições de hiperglicemia e hiperinsulinemia, a via lipogênica é continuamente estimulada promovendo uma elevada produção de TG, favorecendo, assim, o aparecimento das dislipidemias (Samuel and Shulman 2016).

O excessivo acúmulo de lipídios no hepatócito resulta na doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). A DHGNA é a mais frequente desordem hepática crônica na população a nível global (Kitade et al. 2017) e a terceira principal causa de hepatocarcinoma (HCC). A DHGNA inclui diferentes estágios de gravidade da doença, variando de esteatose a esteato-hepatite (NASH), que pode evoluir para cirrose e HCC. A esteatose hepática está presente em até 70% dos pacientes com DM2 e 90% dos pacientes obesos, sendo fator de risco direto para as doenças cardiovasculares, as principais causas de mortalidade no mundo (Vallianou et al. 2019).

### **2.3 Açúcares de adição e a síndrome metabólica**

Os açúcares são encontrados naturalmente em frutas, vegetais, alguns grãos, leite humano, leite e seus derivados, mas também são adicionados aos alimentos durante o processo de preparação/produção ou adicionados no momento do consumo (Fidler Mis et al. 2017). O termo “açúcares de adição” refere-se a sacarose, frutose, glicose, hidrolisado de amido (xarope de glicose ou xarope rico em frutose) e outras preparações de açúcar isolados usadas para tal ou adicionadas durante a preparação ou fabricação do alimento (Bresson et al. 2009). O principal açúcar usado em alimentos processados é a sacarose, um dissacarídeo constituído por dois açúcares simples, glicose e frutose. Na década de 60, a demanda por açúcar em alimentos e bebidas industrializadas levou a criação do xarope de milho rico em frutose, uma mistura de glicose e frutose feita a partir do amido de milho por uma conversão enzimática de glicose em frutose. O consumo desses açúcares, em refrigerantes e em outras bebidas adoçadas com açúcar, aumentou consideravelmente nas últimas décadas (Giugliano et al. 2018).

Estudos epidemiológicos em todo mundo mostram que a ingestão total de açúcar varia de 14,5 a 21,9% da energia total ingerida diariamente entre adultos de países como a Itália e os



Estados Unidos (EUA) (Wittekind and Walton 2014). Em alguns países Latino-Americanos como o Brasil, o consumo de açúcares de adição está em torno de 25% da energia total ingerida diariamente, principalmente na infância, sendo que cerca de 60% da população em geral relatou consumir açúcar de maneira excessiva (Fisberg et al. 2018).

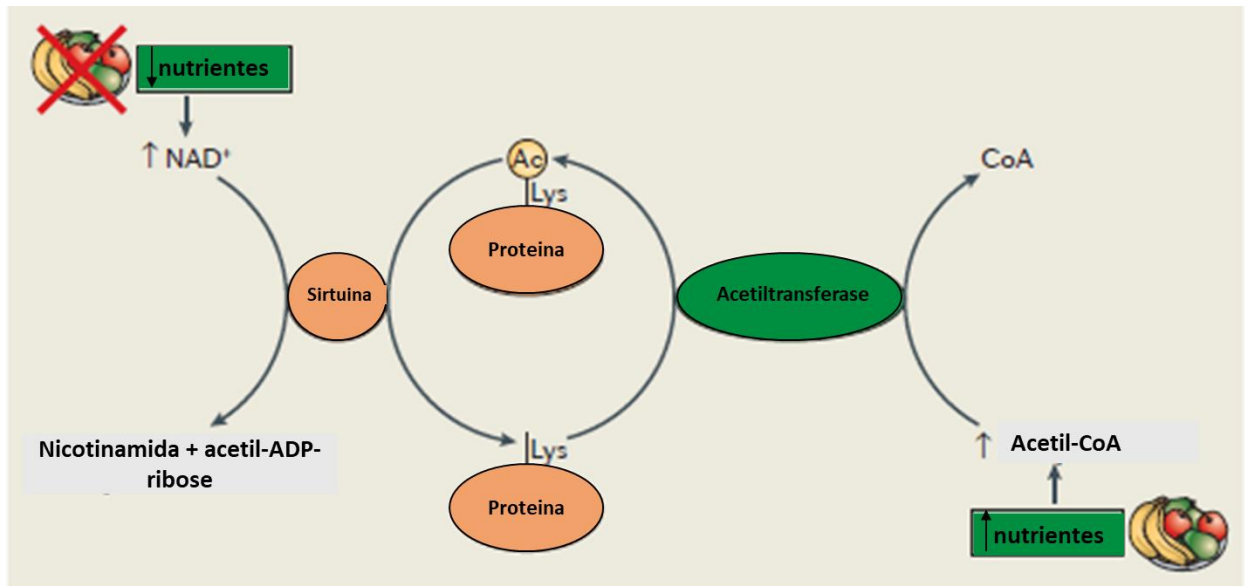
A Organização Mundial de Saúde (OMS) destacou o consumo de açúcar livre, definido como a soma de açúcares naturalmente presentes no mel, xaropes, sucos de frutas e concentrados de suco de frutas, sendo associado a uma dieta de má qualidade, além do risco aumentado para o desenvolvimento de cárie dentária, obesidade e doenças crônicas não transmissíveis (Organization 2015). O elevado consumo de bebidas adoçadas com açúcar está associado com o aumento da prevalência de SM, elevado risco para obesidade e o risco aumentado para o desenvolvimento do diabetes (Giugliano et al. 2018). Estudos mostraram que a frutose, principal componente de refrigerantes e de açúcares de adição em geral, parece ser particularmente nociva ao ser associada com o desenvolvimento de fatores de risco relacionados à SM, incluindo obesidade, dislipidemia, esteatose hepática, hipertensão, resistência insulínica e diabetes (Johnson et al. 2017; Hannou et al. 2018).

Além disso, o consumo excessivo de frutose pode ter significativos efeitos no metabolismo de lipídios, contribuindo para a esteatose hepática e para o aumento dos níveis séricos de triglicerídeos na forma de *very low-density lipoprotein* (VLDL). O acúmulo de lipídios no fígado resulta da combinação do aumento da lipogênese *de novo* (DNL) hepática, esterificação de ácidos graxos pré-formados derivados da dieta ou do tecido adiposo, diminuição da secreção de VLDL e redução da oxidação hepática de ácidos graxos. Além disso, a frutose contribui para a produção de triglicerídeos pelo fígado, atuando como substrato para a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos e pela ativação do sistema de sinalização que aumenta a produção de lipídios (Sobrecases et al. 2010; Crescenzo et al. 2013; Hannou et al. 2018). Dessa forma, contribui para contribuindo para o desenvolvimento da esteatose e resistência

inuslínica hepática (Ter Horst and Serlie 2017). Adicionalmente, o consumo elevado desse monossacarídeo pode induzir a resistência a leptina que em contrapartida, promove o aumento da ingestão de alimentos e obesidade (Zhang, Jiao, and Kong 2017).

Estudos vem mostrando que os açúcares também estão envolvidos na regulação de processos metabólicos via acetilação de proteínas no tecido hepático (Meyer et al. 2018; Softic et al. 2019). Este processo é a principal modificação pós-traducional a ocorrer em eucariotos. Trata-se da transferência de um grupo acetil proveniente da acetil-coenzima A (acetil-CoA) para um sítio específico na sequência de aminoácidos da proteína (Drazic et al. 2016). A adição de grupos acetil aos resíduos de lisina de proteínas não-histônicas, neutraliza a carga positiva de grupos  $\epsilon$ -amino, podendo afetar a estrutura e a atividade da proteína (Ali et al. 2018). A acetilação é dependente da disponibilidade do nutriente. Por exemplo, períodos de jejum ou restrição calórica aumenta a oxidação de ácidos graxos e, dessa forma, aumenta a produção de acetil-CoA, que pode servir como substrato para a acetilação de proteínas mitocondriais (Kim et al. 2006; Schwer et al. 2009). A conversão do piruvato em acetil-CoA também contribui para o *pool* de acetil-CoA tanto a nível mitocondrial quanto a nível nuclear, alterando os padrões de acetilação de proteínas histônicas e não-histônicas (Menzies et al. 2016).

No processo de acetilação dos resíduos de lisina de proteínas estão envolvidas enzimas chamadas de acetiltransferases de lisina (KATs). Esse processo pode ser reversível, sendo um alvo crucial para a ativação e desativação de certas vias celulares, especialmente para processos de regulação transcricional de genes, e depende da participação das chamadas deacetilases de lisina (KDACs). Estas enzimas são divididas em dois grupos distintos com diferentes mecanismos catalíticos: deacetilases de histonas (HDACs) dependentes de  $Zn^{+}$  e Sirtuinas dependentes de  $NAD^{+}$  (nicotinamida adenina dinucleotídeo). Portanto, a acetilação é dependente de acetil-CoA e as sirtuinas usam  $NAD^{+}$  como co-substrato (**Figura 2**) (Drazic et al. 2016; Verdin and Ott 2015).



**Figura 2. A relação entre acetilação de proteínas e metabolismo.** O metabolismo pode influenciar a acetilação de proteínas através de mudanças na concentração intracelular de  $\text{NAD}^+$  e acetil-coenzima A (acetil-CoA). Por exemplo, a concentração relativa de  $\text{NAD}^+$  aumenta, levando ao aumento da atividade enzimática de sirtuinas e a deacetilação de seus alvos. A atividade de acetiltransferases varia de acordo com a concentração de acetil-CoA. Quando houver aumento da carga de nutrientes e a concentração de acetil-CoA aumentar, o aumento da atividade da acetiltransferase promoverá a acetilação de proteínas alvo. Fonte: Verdin & Ott (2014) com modificações.

Alguns eventos de acetilação de resíduos de lisina podem ocorrer de maneira não enzimática via interação direta da proteína com a acetil-CoA. Esta reação seria favorecida pelo pH elevado e pelas altas concentrações de acetil-CoA, condições que certamente estão presentes na mitocôndria (Baeza, Smallegan, and Denu 2015). Nesse contexto, um estudo recente mostrou o papel de uma proteína mitocondrial chamada acil-CoA tioesterase (Acot9) no tecido hepático, a qual está envolvida no transporte de acetil-CoA para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Foi mostrado que animais *knockout* para a Acot9 apresentavam maiores níveis de acetilação de proteínas hepáticas ao contrário dos animais com a expressão normal desta proteína. Os autores sugerem que a presença da Acot9 acaba sendo um fator limitante da disponibilidade de acetil-CoA para os processos de acetilação de proteínas (Steensels et al. 2020).

Dietas ricas em açúcar também são capazes de alterar a composição da microbiota intestinal, principalmente reduzindo a diversidade bacteriana. Dessa forma, alguns grupos

específicos acabam sendo favorecidos e tem a sua abundância aumentada (Do et al. 2018; Laffin et al. 2019). Neves et al. (2020) observaram que ratos *Wistar* alimentados com uma dieta rica em açúcar (36, 32% do conteúdo de carboidratos foi referente à adição de sacarose) por 15 semanas, apresentaram aumento da abundância de sub-classes pertencentes ao filo Proteobacteria, grupos esses associados ao desenvolvimento de desordens metabólicas como a obesidade (de Oliveira Neves et al. 2020). Além disso, o epitélio intestinal pode ser prejudicado tendo a sua permeabilidade aumentada e permitindo a translocação de metabólitos bacterianos como o LPS, favorecendo o desenvolvimento de endotoxemia metabólica e processos inflamatórios no próprio epitélio intestinal como a doença inflamatória intestinal (Khan et al. 2020; Laffin et al. 2019; Satokari 2020).

#### **2.4 Papel da microbiota intestinal na síndrome metabólica**

Ao longo do seu processo evolutivo, os seres humanos evoluíram em conjunto com uma grande diversidade de microrganismos, hoje denominada microbioma. Essa relação de simbiose foi imprescindível para a adaptação a novas fontes de alimentos e a exploração de novos ambientes pelos indivíduos da nossa espécie (McFall-Ngai et al. 2013) como também para a manutenção do nosso estado de saúde. O microbioma intestinal corresponde a uma complexa comunidade de microrganismos (bactérias, fungos e vírus) residentes em nosso intestino (Cani 2018). É estimado que o número de células microbianas seja 10x maior que o número de nossas próprias células, sendo o genoma bacteriano constituído por cerca de 10 milhões de genes que complementam as funções do genoma humano, conferindo uma maior diversidade metabólica (Qin, Li, Raes, Arumugam, Burgdorf, Manichanh, Nielsen, Pons, Levenez, Yamada, Mende, Li, Xu, Li, Li, Cao, Wang, Liang, Zheng, Xie, Tap, Lepage, Bertalan, Batto, Hansen, Le Paslier, Linneberg, Nielsen, Pelletier, Renault, Sicheritz-Ponten, Turner, Zhu, Yu, Li, Jian, Zhou, Li, Zhang, Li, Qin, Yang, Wang, Brunak, Doré, et al. 2010).

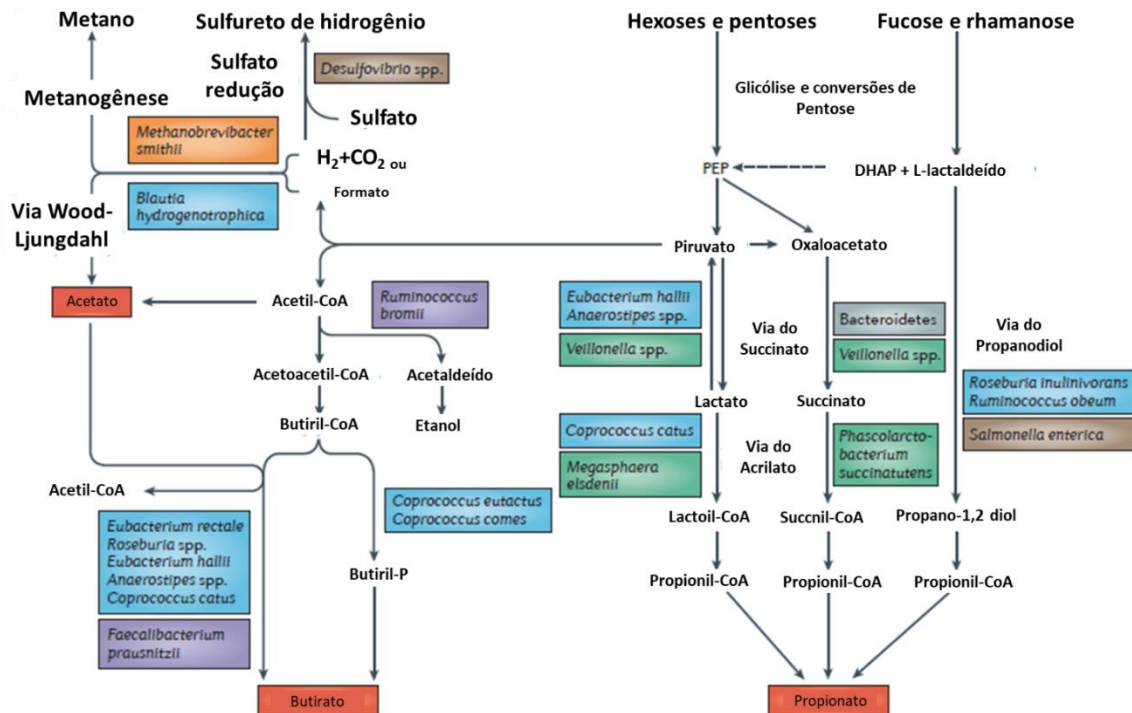
A maioria das espécies presentes na microbiota intestinal humana são constituintes dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, como também podem estar presentes, geralmente em menor número, espécies pertencentes aos filos Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia ("Structure, function and diversity of the healthy human microbiome" 2012). As proporções relativas de cada um desses filos variam entre os indivíduos como também no próprio indivíduo ao longo de sua vida (Yatsunenکو et al. 2012).

Muitos nutrientes comuns na dieta humana como gorduras, açúcares simples e proteínas são completamente digeridos, enquanto outros, principalmente carboidratos complexos, não são completamente digeridos. Dessa forma, vários carboidratos que não são digeridos no trato gastrointestinal superior são fermentados pela microbiota intestinal. Como resultado dessa fermentação, muitos metabólitos são gerados, incluindo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como o acetato, o butirato e o propionato. Esses metabólitos microbianos estão envolvidos em vários processos fisiológicos desde o metabolismo energético, lipídico e da glicose até processos imunes, inflamatórios e câncer (Cani and Jordan 2018). Além disso, a microbiota intestinal sintetiza vitaminas e aminoácidos essenciais, como também participa da degradação de xenobióticos e regulação do sistema imune (Gill et al. 2006; Lozupone et al. 2012).

A composição da microbiota intestinal pode ser alterada por vários fatores, como o uso de antibióticos, probióticos e suplementos dietéticos, a dieta e o tipo de ambiente ao qual este indivíduo está exposto (Tamburini et al. 2016). Alterações na diversidade ou estrutura da microbiota intestinal conhecida como disbiose pode afetar o metabolismo do hospedeiro favorecendo o desenvolvimento de obesidade e demais desordens metabólicas como dislipidemias, diabetes e doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) (Vallianou et al. 2019).

A relação entre microbiota intestinal e obesidade foi estabelecida a partir de estudos com camundongos germ-free (GF) (Brahe, Astrup, and Larsen 2016). Um estudo demonstrou que camundongos GF adultos que foram colonizados com a microbiota de animais criados em condições convencionais apresentaram um aumento de 60% de gordura corporal e resistência à insulina mesmo tendo um consumo de ração reduzido. Os autores sugerem que a microbiota foi capaz de suprimir a expressão do fator adipocitário induzido por jejum (Fiaf) nos camundongos convencionais, com consequente aumento da atividade da lipoproteína lipase (LPL) o que favoreceu o estoque de triglicérides nos adipócitos desses animais (Bäckhed et al. 2004). Em outro estudo, a colonização de animais GF com a microbiota de animais obesos, resultou em ganho de massa gorda nesses animais (Turnbaugh et al. 2006). Camundongos GF convencionais (colonizados com a microbiota de animais GF criados em condições normais) e alimentados com dieta rica em gordura e açúcar apresentaram uma redução na expressão da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) fosforilada no músculo e no fígado. Com isso, ocorreu redução na oxidação de ácidos graxos e aumento do estoque de gorduras (Bäckhed et al. 2007).

Componentes da dieta que não são completamente digeridos são fermentados por bactérias anaeróbicas no intestino grosso. Como subprodutos desse processo de fermentação são gerados gases e ácidos orgânicos, particularmente três principais ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acetato, propionato e butirato (Louis, Hold, and Flint 2014). O acetato pode ser gerado tanto a partir da hidrólise da acetil-CoA como também pela via Wood-Ljungdahl usando o formato. O propionato pode ser formado a partir da fosfoenolpiruvato (PEP) através da via do acrilato ou do succinato, pela redução do lactato a propionato. O butirato é formado a partir de duas moléculas de acetil-CoA pela ação da enzima butirato-quinase ou a partir do acetato pela ação da butiril-CoA:acetato-CoA-transferase (den Besten, van Eunen, et al. 2013; Louis, Hold, and Flint 2014; Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, and Backhed 2016) (**Figura 3**)



**Figura 3. Vias responsáveis pela biossíntese dos principais metabólitos microbianos resultantes da fermentação de carboidratos.** O acetato, um dos três principais ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, mostrado em vermelho) pode ser produzido por muitas bactérias entéricas a partir do piruvato, via acetil-CoA e pela via Wood-Ljungdahl. O butirato é formado a partir de duas moléculas de acetil-CoA por vários Firmicutes ou a partir do acetato pela ação da butiril-CoA:acetato-CoA-transferase, geralmente usada para catalisar este último passo. A principal via de produção do propionato é pela via do succinato, geralmente usada por Bacteroidetes para gerar propionato de carboidratos e por alguns Firmicutes que produzem propionato a partir do lactato ou succinato. Duas outras vias de produção de propionato são encontradas em algumas bactérias do intestino: a via do acrilato, que usa lactato, e a via do propanodiol, que usa fucose e rhamanose. Arqueas são mostradas em laranja. Bacteroidetes em cinza. Lachnospiraceae (Firmicutes) em azul. Ruminococcaceae (Firmicutes) em roxo. Negativicutes (Firmicutes) em verde e Proteobacteria em marrom. DHAP, dihidróxiacetonafofato; PEP, fosfoenolpiruvato. Fonte: Louis et al. (2014) com modificações.

Os AGCC podem ter origem endógena, através da oxidação de gorduras, principalmente associado a cetose em períodos de jejum, gerando acetato, propionato e butirato. Também podem ser resultantes do metabolismo da acetil-CoA, pela ação da acetil-CoA hidroxilase, particularmente o acetato. O propionato também pode ser gerado a partir do metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada. Porém, acredita-se que a quantidade de AGCC resultantes destes processos metabólicos não seja suficiente para o aumento dos mesmos a níveis séricos. Sendo assim, a principal origem desses ácidos graxos está relacionada a processos fermentativos que ocorrem, particularmente, no intestino grosso como resultado da atividade

microbiana (Tan et al. 2014). Dietas ricas em carboidratos, particularmente fibras fermentáveis, são os principais substratos usados pela microbiota para a geração desses metabólitos (Gill et al. 2018).

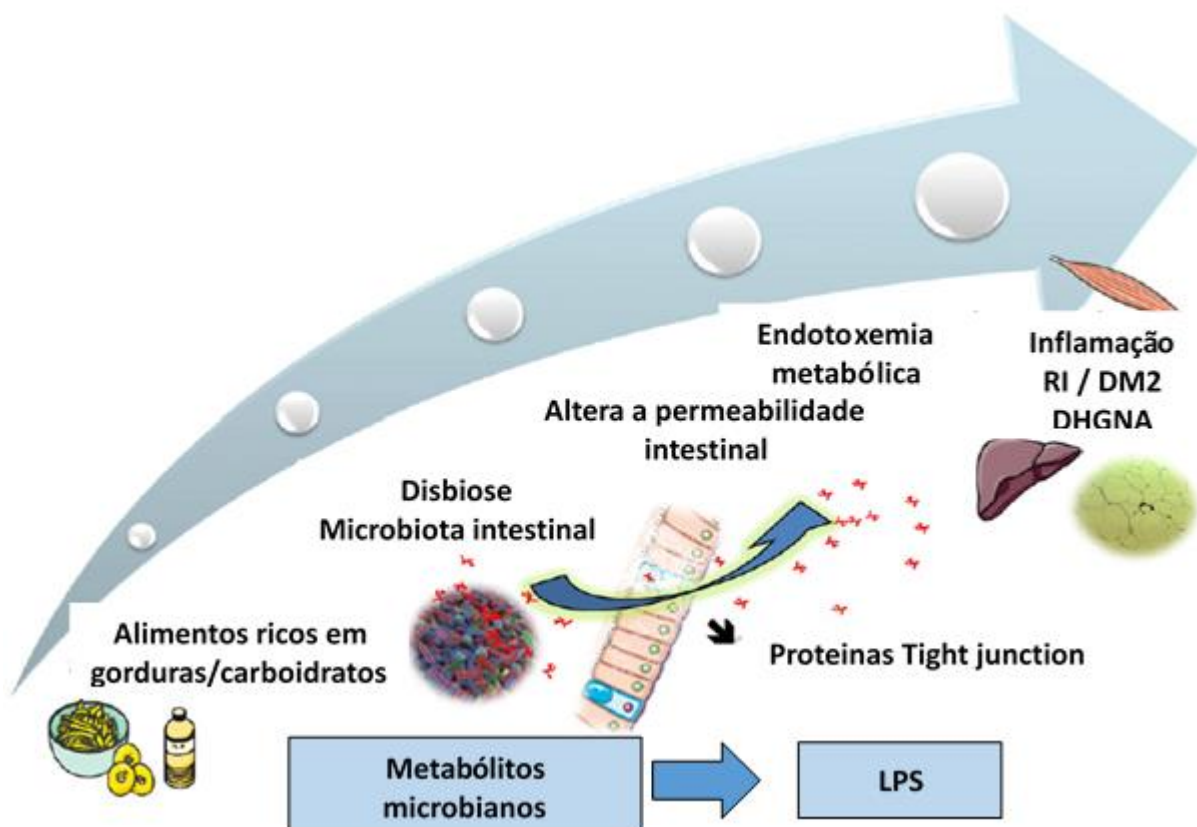
Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) estão envolvidos em diferentes mecanismos de indução de saciedade (Vallianou et al. 2019). Em estudos *in vivo*, os AGCC promoveram o aumento das concentrações plasmáticas de hormônios intestinais, como o peptídeo semelhante a glucagon tipo-1 (GLP-1) e peptídeo intestinal YY (PYY), acompanhado de reduções do peso corporal e gordura hepática, além de melhora da sensibilidade insulínica (Yamashita et al. 2007; Chambers et al. 2015; Psichas et al. 2015; van der Beek et al. 2016; Aoki et al. 2017). Também foi observado efeito semelhante desses AGCC na indução da secreção desses hormônios em estudos *in vitro* (Tolhurst et al. 2012; Larraufie et al. 2018). Além disso, foram associados a promoção da termogênese no tecido adiposo (Gao et al. 2009; Jocken et al. 2017), como substrato para a gliconeogênese, tanto hepática quanto intestinal, contribuindo para o controle dos níveis de glicose (den Besten, van Eunen, et al. 2013; De Vadder et al. 2014). Apesar dos estudos evidenciarem a associação dessas substâncias a efeitos metabólicos benéficos (Aron-Wisniewsky et al. 2020), os AGCC podem ser utilizados como substratos para o metabolismo energético do hospedeiro, atuando como uma fonte extra de energia através da sua participação em processos como a lipogênese e a gliconeogênese (den Besten, Lange, et al. 2013) e, dessa forma, associados ao ganho de peso (Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, and Backhed 2016) e a DHGNA (Rau et al. 2018).

Alterações na composição e abundância de filos dominantes na microbiota intestinal tem sido associada com a obesidade. Os primeiros estudos em modelos animais de obesidade demonstraram que há um aumento de bactérias do filo Firmicutes e uma diminuição de espécies pertencentes ao filo Bacteroidetes (Ley, Backhed, et al. 2005; Turnbaugh et al. 2007). Em humanos, a predominância de Firmicutes em relação a Bacteroidetes foi observada em alguns



estudos (Turnbaugh et al. 2006; Ley et al. 2006), enquanto em outros, foi encontrada a predominância de Bacteroidetes (Armougom et al. 2009; Schwartz, Taras, Schafer, et al. 2010).

A microbiota intestinal exerce um importante papel na função e integridade do efeito de barreira proporcionado pelo epitélio intestinal. Portanto, o aumento da permeabilidade intestinal e, dessa forma, a translocação de produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), promovem a ativação de cascatas pró-inflamatórias, além de comprometer a resposta imune a nível de mucosa intestinal. O LPS pode, assim, contribuir para o desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos, resistência insulínica, diabetes e doença hepática gordurosa não-alcóolica (**Figura 4**) (Jayakumar and Loomba 2019; Sharma and Tripathi 2019).



**Figura 4. A microbiota intestinal está envolvida no início de desordens metabólicas associadas com a obesidade:** a dieta está associada a disbiose da microbiota intestinal que promove alterações na permeabilidade intestinal (alterando a distribuição das proteínas *tigh junction*) e, dessa forma, produtos bacterianos como o LPS chegam a circulação sanguínea provocando a endotexemia metabólica, iniciando os processos de inflamação crônica sub-clínica, resistência insulínica nos tecidos adipose, muscular e fígado com consequente desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 e doença hepática gordurosa não-alcóolica. Figura adaptada de Cani & Delzene, 2011.

Esse distúrbio da resposta imune associada a mucosa intestinal tem influência sobre a autoimunidade mediada por células T e, portanto, relação com desordens autoimunes como o diabetes mellitus tipo 1 (Paun, Yau, and Danska 2017). Em estudo realizado com humanos com diabetes tipo 2, foi observado um aumento da permeabilidade intestinal em comparação com indivíduos do grupo controle (Horton et al. 2014). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com animais (Ding and Lund 2011; Xiao et al. 2014). Em indivíduos diabéticos foi observado a abundância de Bacteroidetes e Proteobacteria (Larsen et al. 2010). Também tem sido demonstrado a redução de *Akkermansia* em animais obesos (Everard et al. 2013), *Bifidobacterium* e *F. prausnitzii* em humanos com DM2 (Qin et al. 2012). A presença destas bactérias no epitélio intestinal promove a diminuição da permeabilidade, com consequente redução da translocação de produtos bacterianos. Dessa forma, ocorreu a redução de marcadores inflamatórios, como também o equilíbrio dos níveis plasmáticos de glicose (Ley, Backhed, et al. 2005).

A relação entre microbiota intestinal e DHGNA foi evidenciada a partir de um estudo com camundongos GF. Esses animais ao serem colonizados com a microbiota fecal de animais com DHGNA desenvolveram um perfil metabólico semelhante aos doadores fecais, apresentando esteatose macrovesicular, hipertrigliciridemia, aumento da lipogênese *de novo* e da expressão de fatores transcricionais associados à ativação de genes codificantes de enzimas lipogênicas. Os autores também observaram que esses animais apresentaram diferenças quanto a composição da microbiota intestinal, com predomínio de bactérias do filo Firmicutes, comparado ao grupo que foi colonizado com fezes de animais sem DHGNA (Le Roy et al. 2013). Estudos em humanos com DHGNA apresentaram aumento de bactérias do filo Proteobacteria (Loomba et al. 2019). Resultado semelhante foi observado em pacientes com NASH, onde também houve predominância de Proteobacterias, especificamente espécies da família Enterobacteriaceae, gênero *Escherichia*. Nesse mesmo estudo, os pacientes com NASH

apresentaram um aumento do número de Bacteroidetes e diminuição de Firmicutes, além da redução na abundância de espécies do filo Actinobacteria (especificamente do gênero *Bifidobacterium*) (Zhu et al. 2013).

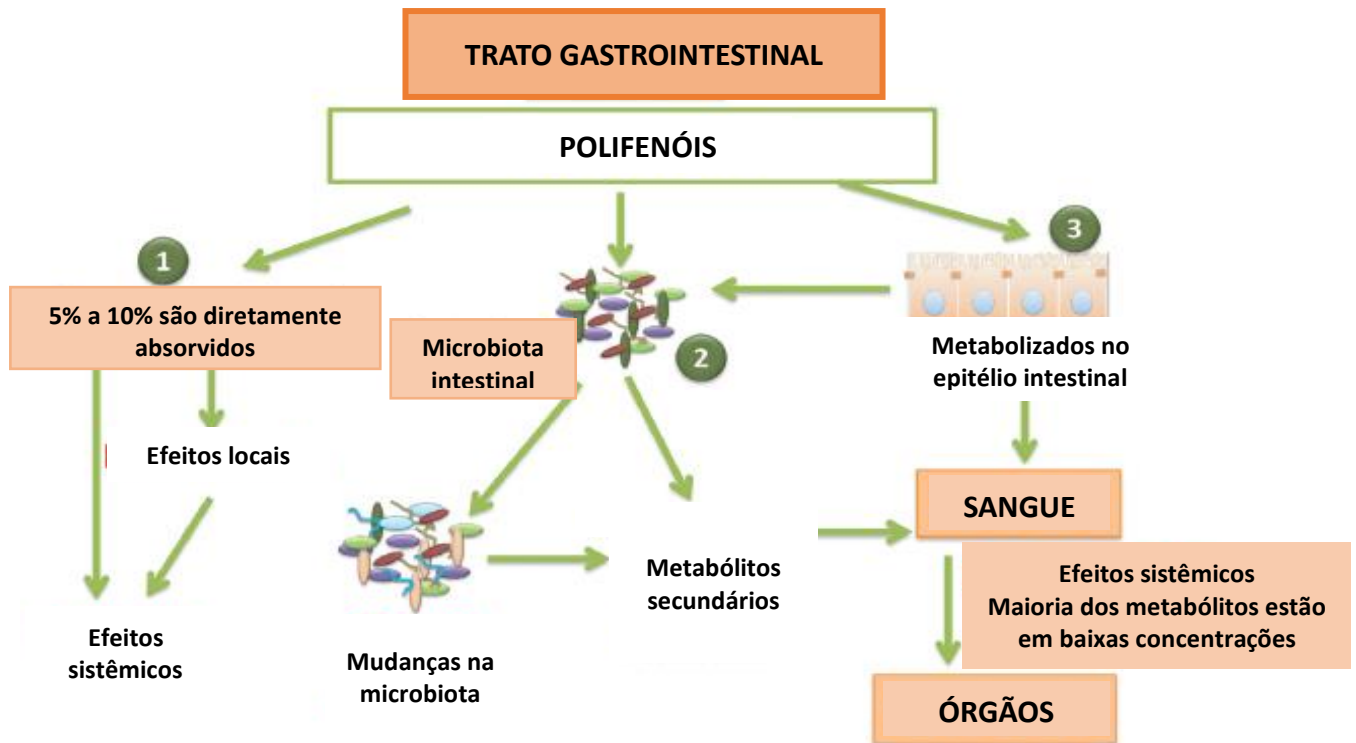
Um provável mecanismo pelo qual a microbiota intestinal pode contribuir para o desenvolvimento da DHGNA e sua severidade inclui a inflamação e aumento da permeabilidade do epitélio intestinal (Boursier and Diehl 2016). Pacientes obesos com DHGNA apresentaram níveis elevados da proteína ligadora de LPS (LBP) no plasma, sendo ainda mais elevado em pacientes com NASH. Além disso, a expressão de RNA mensageiro do gene TNF- $\alpha$  foi aumentada no tecido hepático desses pacientes, evidenciando o papel do LPS no desenvolvimento da NASH em pacientes obesos (Ruiz et al. 2007).

Com o crescente entendimento acerca do papel da microbiota intestinal no desenvolvimento da síndrome metabólica, a investigação de novas e potenciais estratégias de modulação dessa microbiota vêm sendo estudadas. Entre elas, podemos citar o uso de fármacos, probióticos e prebióticos como os polifenóis (Li, Watanabe, and Kimura 2017).

## **2.5 Polifenóis e a modulação da microbiota intestinal**

Os polifenóis são metabólitos secundários de plantas que existem amplamente em vegetais e frutas que podem promover benefícios a saúde, particularmente associados a prevenção de doenças crônicas, tendo sua ação antioxidante como principal propriedade (Tsao 2010). Cerca de 8000 compostos fenólicos já foram identificados e de acordo com a sua estrutura química estão classificados em dois subgrupos: flavonoides e não flavonoides, que inclui os ácidos fenólicos (Fraga, Croft, Kennedy, and Tomás-Barberán 2019). Polifenóis presentes na dieta são pobremente absorvidos, sendo considerado que apenas cerca de 5% do total de polifenóis ingerido é totalmente absorvido. Além disso, esses compostos sofrem

intensiva biotransformação pela microbiota intestinal, gerando uma ampla variedade de novas estruturas químicas que facilmente chegam a circulação sistêmica (**Figura 5**) (Luca et al. 2019).



**Figura 5: Relação entre os polifenóis e a microbiota intestinal:** Está bem estabelecido que a biodisponibilidade dos polifenóis depende da sua metabolização por enzimas hidrolíticas presentes no epitélio intestinal e em grande parte pela microbiota intestinal. Após serem ingeridos, os polifenóis podem: (1) - exercer efeitos diretos no trato gastrointestinal associado, por exemplo, ao seu potencial antioxidante; ou atuar de maneira sistêmica induzindo a liberação de hormônios associados a homeostase de glicose pelas células enteroendócrinas. (2) - podem interagir com a microbiota promovendo alterações na sua composição, por exemplo, favorecendo o crescimento de bactérias benéficas; ou biotransformados pela microbiota, gerando assim moléculas menores mais facilmente absorvidas e, portanto, chegando até aos órgãos distais. Promovem também efeitos sistêmicos, pela indução da liberação de hormônios intestinais pelas células enteroendócrinas. (3) - podem ser metabolizados pelas células do epitélio intestinal e de lá podem chegar a circulação ou serem excretados de volta ao lúmen do intestino. Assim, o metabolismo dos polifenóis no trato gastrointestinal, principalmente, pela microbiota intestinal é de extrema importância para os efeitos benéficos promovidos por esses compostos ao metabolismo do hospedeiro. Figura adaptada de Oteiza et al., 2018.

O metabolismo dos polifenóis pelas bactérias intestinais envolve a quebra das ligações glicosídicas e a decomposição do esqueleto heterocíclico. Os glicanos, resultantes da clivagem dos glicosídeos, são nutrientes essenciais para a maioria das bactérias constituintes da

microbiota intestinal (Ozdal et al. 2016). Evidências sugerem que os polifenóis presentes na dieta participam da modulação da microbiota intestinal, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, controlando a população de bactérias comensais e probióticos, favorecendo assim, uma melhor interação microbiota-hospedeiro, promovendo efeitos benéficos (Tomás-Barberán, Selma, and Espín 2016).

Alguns polifenóis encontrados no chá verde e preto, podem inibir o crescimento de bactérias nocivas como *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (Duda-Chodak et al. 2015), enquanto outros polifenóis favorecem a proliferação de bactérias benéficas como *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Akkermansia muciniphila* e *Faecalibacterium prausnitzii*, além de modular a razão Firmicutes/Bacteroidetes (Jin et al. 2012; Gwiazdowska et al. 2015; Masumoto et al. 2016; Moreno-Indias, Sánchez-Alcoholado, et al. 2016). O crescimento dessas bactérias probióticas (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Akkermansia muciniphila*) contribuem para a redução da permeabilidade intestinal como também ajudam na prevenção e tratamento da obesidade e síndrome metabólica (Neyrinck et al. 2013; Lin et al. 2019).

A modulação da razão Firmicutes/Bacteroidetes, geralmente com redução de Firmicutes e aumento de Bacteroidetes, tem sido associada com a melhora dos níveis de glicose, diminuição do acúmulo de gordura e peso corporal (Lin et al. 2019). Em estudo com humanos, indivíduos que receberam vinho tinto sem álcool (rico em antocianinas), por um período de 20 dias apresentaram redução da pressão arterial, níveis de triglicerídeos, colesterol total e proteína C reativa também reduzidos. Os autores associam esses benefícios ao aumento de Bacteroidetes e redução de Firmicutes (Queipo-Ortuño et al. 2012). Em estudo com animais, foi observado que a administração de quercetina promoveu redução na razão Firmicutes/Bacteroidetes com redução no ganho de peso corporal e níveis séricos de insulina (Etxeberria et al. 2015). Animais

alimentados com dieta rica em gordura (DRG) e suplementada com extrato de Blueberry apresentaram mudanças na composição da microbiota intestinal caracterizada por uma diminuição de Firmicutes e aumento na abundância de representantes da classe Bacilli e dos filos Fusobacteria e Proteobacteria. Essas mudanças na composição da microbiota foram associadas a uma melhora no efeito de barreira do epitélio intestinal, com consequentes redução da inflamação sistêmica e melhora da resistência insulínica hepática dos animais obesos (Lee et al. 2018).

Além do efeito modulador sobre a microbiota intestinal, já amplamente investigado e demonstrado em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, os polifenóis contribuem para o aumento da produção de AGCC. Em estudo *in vitro*, usando um modelo de fermentação fecal (Batch), foi observado que os elagitaninos presentes no extrato de romã promoveram o aumento das concentrações de acetato, propionato e butirato (Bialonska et al. 2010). A adição de quercetina e fruto-oligossacarídeos (FOS) a dieta de animais aumentou a produção de AGCC, em especial do butirato, enquanto a adição de catequina e FOS, aumentou a concentração de propionato (Zheng et al. 2017). Resultados semelhantes foram observados em estudos com extratos ricos em polifenóis de chá preto (Henning et al. 2018) e chá verde (Wang, Zeng, et al. 2018). Os AGCC podem interferir de maneira benéfica sobre o metabolismo de lipídios, homeostase da glicose, como também estimulando a produção de hormônios envolvidos na regulação do apetite (Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, and Bäckhed 2016).

Os polifenóis também podem participar de mecanismos bioquímicos e moleculares, atuando em vias de sinalização intra e intercelulares, como a regulação de fatores de transcrição nucleares e metabolismo de lipídios, e modulando a síntese de mediadores inflamatórios (Kim, Quon, and Kim 2014; Fraga, Oteiza, and Galleano 2018). Em estudo com o extrato de *Hibiscus sabdariffa* L., foi observado que os animais tratados com o extrato apresentaram redução no acúmulo de gordura no tecido adiposo, no ganho de peso corporal, na dislipidemia

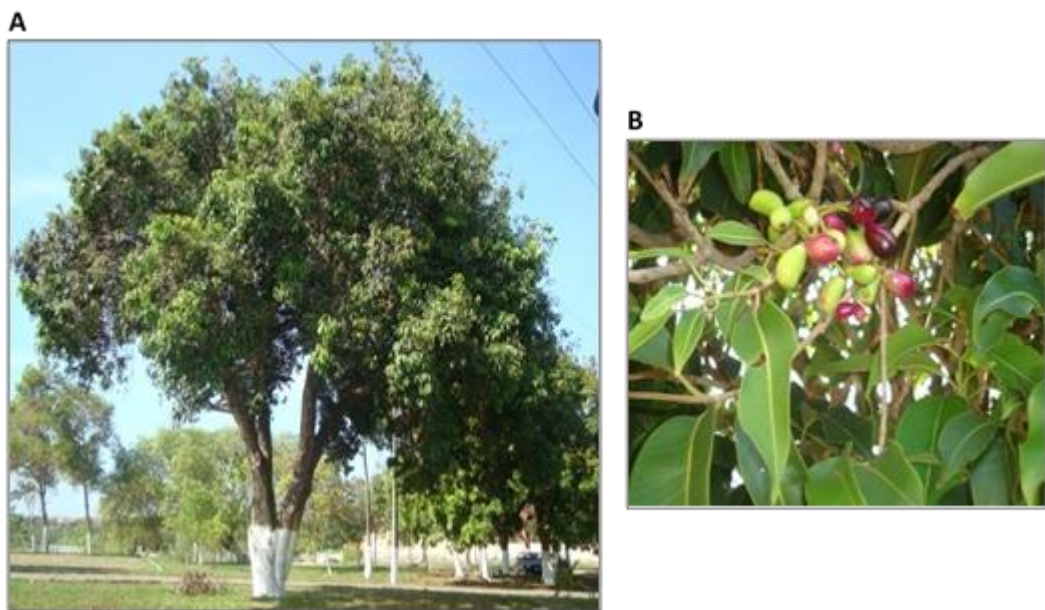
e normalização do índice glicêmico, bem como a melhora da esteatose hepática. Os autores sugerem que o efeito do extrato esteja associado ao seu papel na regulação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) e das proteínas ligadas aos elementos reguladores de esteroide 1c (SREBP1c) (Villalpando-Arteaga et al. 2013). Quercetina e ácido cafeico foram associados ao aumento da expressão da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), envolvida na oxidação de ácidos graxos, em estudos *in vitro* (Ahn et al. 2008; Liao et al. 2013).

## **2.6 *Syzygium cumini* (L) Skeels e seu potencial para o tratamento da síndrome metabólica**

É estimado que até 25% da população adulta em todo o mundo apresente distúrbios metabólicos que se encaixam nos critérios para a classificação de síndrome metabólica (SM). Esses indivíduos têm um risco cinco vezes maior para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 e cerca de duas vezes maior para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (O'Neill and O'Driscoll 2015). As diretrizes para o controle e redução dos casos de SM estão direcionadas para a mudança no estilo de vida, associada a uma menor ingestão de alimentos altamente calóricos e atividade física, combinada a intervenções farmacológicas (Rochlani et al. 2017). Nesse contexto, os fármacos derivados de plantas se apresentam como fonte de compostos bioativos e, portanto, com potencial terapêutico para atuar em diferentes vias metabólicas, devido à grande variedade de compostos com características químicas e farmacológicas diferentes (Mukherjee et al. 2015).

A família Myrtaceae compreende em torno de 121 gêneros com 3800-5800 espécies de arbustos e árvores distribuídas principalmente em áreas tropicais e subtropicais (Stefanello, Pascoal, and Salvador 2011). O gênero *Syzygium* é constituído por cerca de 1100 espécies, dentre elas a espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels (sinonímia: *Syzygium jambolanum* D.C.,

*Eugenia jambolana* Lam.) se destaca por ser amplamente usada na medicina tradicional para o tratamento de várias patologias, principalmente o diabetes (Ayyanar and Subash-Babu 2012). Essa espécie é uma árvore de grande porte, nativa da Índia, mas amplamente distribuída e cultivada em outros países da África, Ásia e América do Sul (Srivastava and Chandra 2013). É popularmente conhecida como *black plum* ou *jambolan* na língua inglesa, *jan* ou *jamun* na Índia, *guayabo pesgua* em países de língua espanhola e jambolão ou jamelão no Brasil (**Figura 6**) (Lim et al. 2012).



**Figura 6.** *Stryzgium cumini* (L.) Skeels. **A.** Imagem de um espécime no campus Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA. **B.** Detalhes da folhas e frutos da espécie. Fonte: própria

A espécie *S. cumini* é amplamente conhecida por apresentar diversas propriedades medicinais, que são atribuídas à presença de compostos bioativos presentes em várias partes dessa planta. As folhas são usadas no tratamento de gastropatias, dermatopatias, constipação e leucorréia (Bhandary, Chandrashekar, and Kaveriappa 1995); os frutos usados no tratamento de faringites e doenças esplênicas, enquanto as sementes têm sido usadas como adstringente e diurético (Baliga et al. 2011). Estudos farmacológicos têm demonstrado as atividades biológicas do *S. cumini*, incluindo-o como antihiperlicemiante (Kumar et al. 2008), cardioprotetor (Mastan et al. 2009) e antioxidante (Sanches et al. 2016; Arun et al. 2011a).



Além disso, estudos mais recentes investigaram o seu potencial para o tratamento da hiperlipidemia (Silva et al. 2012) e da obesidade (Dickel, Rates, and Ritter 2007). Em 2009 o Ministério da Saúde a incluiu na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), reconhecendo o seu importante papel no contexto etnofarmacológico brasileiro (BRASIL and Saúde 2009).

O uso mais comum do *S. cumini* tem sido no tratamento do diabetes, propriedade que vem sendo estudada há mais de 100 anos pela medicina ocidental (Helmstädter 2008). Nos últimos anos, vários estudos avaliaram o extrato, especialmente das sementes, desta espécie para a investigação do seu efeito anti-hiperglicêmico (Ravi, Rajasekaran, and Subramanian 2003; Schossler et al. 2004; Anandharajan et al. 2006; Sharma, Balomajumder, and Roy 2008b; Sharma et al. 2008; Ramya, Neethirajan, and Jayakumararaj 2012; Silva et al. 2012). Ratos com obesidade induzida por estreptozotocina (STZ) foram tratados com o extrato etanólico das sementes rico em flavonoides apresentaram reduzidos níveis de glicose tanto na circulação sanguínea quanto na urina (Ravi, Rajasekaran, and Subramanian 2003). Esse mesmo extrato também foi capaz de restaurar a sensibilidade à insulina periférica em ratos (500mg/kg/ dia, 21 dias) (Sharma, Balomajumder, and Roy 2008b) e camundongos (300 mg/Kg/dia, 15 dias) (Sharma et al. 2008) diabéticos. O efeito observado nesses estudos foi atribuído ao aumento da atividade dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)  $\alpha$  e  $\gamma$ . Além disso, o extrato foi capaz de promover o aumento da atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de glicogênio no fígado desses animais, estimulando a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, favorecendo assim, o aumento da captação de glicose periférica (Sharma, Balomajumder, and Roy 2008b).

Baldissera et al. (2016) demonstraram que ratos com diabetes induzida por dieta rica em gordura e STZ tratados com o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *S. cumini* por 6 semanas apresentaram redução nos níveis glicêmicos quando comparados aos níveis glicêmicos

dos animais diabéticos. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos (Schoenfelder et al. 2010; Tripathi and Kohli 2014). Ulla et al. (2017) avaliaram o efeito do pó das sementes de *S. cumini* sobre ratos com obesidade induzida por dieta rica em gordura e observaram que a suplementação de 2,5% do pó à dieta, por um período de 8 semanas, foi capaz de restabelecer a tolerância à glicose, a sensibilidade a insulina, assim como, a concentração de insulina na circulação dos animais. Esses autores sugerem que a presença de polifenóis como os ácidos gálico e elágico presente no pó das sementes seriam responsáveis pelos efeitos benéficos observados (Ulla et al. 2017).

No entanto, ainda são escassos estudos que investiguem os mecanismos pelos quais o extrato possa promover essa ação anti-hiperglicemiante. Um estudo *in vitro* em células musculares L6, incubadas com o extrato metanólico das folhas (1 ng/mL- 10 µg/mL) por 24h, promoveu o aumento da captação de glicose por essas células. Esse efeito foi associado ao aumento da expressão de RNA mensageiro do transportador de glicose (GLUT4) e da fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K), ambos envolvidos na cascata de sinalização insulínica de células musculares e adipócitos (Anandharajan et al. 2006). Estudo recente do nosso grupo, demonstrou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini*, rico em polifenóis, estimulou a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos com resistência insulínica. Essas células foram incubadas com o extrato por 30 dias na dose de 500mg/Kg/dia. O mesmo resultado foi observado em linhagens de células β humanas incubadas com o extrato por 1h na dose de 100µg/mL (Sanches et al. 2016).

Com relação as desordens do metabolismo de lipídios, os estudos avaliaram os efeitos do *S. cumini* sobre as dislipidemias associadas ao diabetes. Foi observada uma ação anti-hiperlipidêmica do extrato rico em flavonóides de sementes de *S. cumini* (300 mg / kg / dia, 15 dias). O tratamento dos ratos diabéticos com esse extrato reduziu os níveis circulantes de colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídeos (TG), bem como aumentou os níveis de

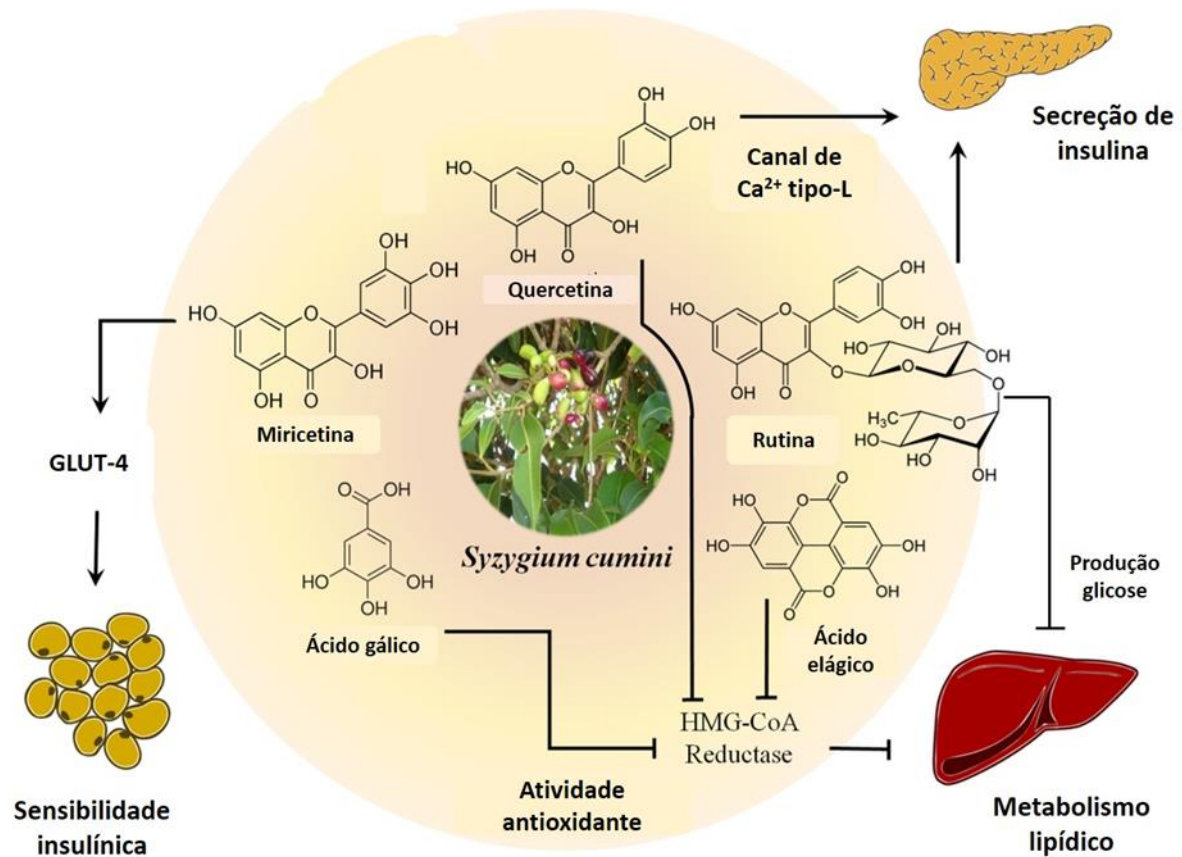
colesterol HDL (Sharma et al. 2008). Resultados semelhantes foram apresentados em estudo com o extrato aquoso de frutas nas doses de 100 e 200 mg / kg (Rekha, Balaji, and Deecaraman 2008), como também para o extrato hidroalcoólico do grão da semente (100 mg / kg / dia, 30 dias) (Ravi, Rajasekaran, and Subramanian 2005a) e para administração de Dihar (100 mg / kg / dia, 6 semanas), uma mistura indiana de ervas contendo *S. cumini* (Patel, Shah, and Goyal 2009). Schoenfelder et al. (2010) realizaram um tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *S. cumini* em animais com diabetes induzida por aloxana e observaram que houve redução significativa dos TG séricos. Os autores também observaram que os melhores resultados foram apresentados pelas doses de 0,125 g/Kg e 0,5 g/Kg (Schoenfelder et al. 2010).

Em estudos recentes do nosso grupo foram demonstrados que ratos obesos-MSG hipertrigliceridêmicos apresentaram uma redução significativa dos TG após o tratamento com o EH nas doses de 0,5 e 1,0 g/kg (Sanches et al. 2016; França et al. 2019). Com relação a atividade anti-hipertrigliceridêmica do extrato, França et al. (2019) sugerem que esse efeito esteja associado a capacidade do extrato em inibir a expressão e atividade da via XBP-1s/PDI/MTP reduzindo dessa formação a incorporação e exportação de triglicerídeos através da formação de partículas de VLDL (França et al. 2019). Um outro mecanismo sugerido para a ação hipolipemiante do extrato de *S. cumini* seja através da indução de uma maior atividade dos receptores ativador por proliferadores de peroxissoma (PPAR)  $\alpha$  e  $\gamma$  (Sharma et al. 2008).

Sendo o fígado um órgão importante no controle do metabolismo de lipídios, estudos do nosso grupo avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico rico em polifenóis sobre a esteatose hepática. Ratos obesos MSG tratados com o extrato na dose de 500 mg/Kg por 30 dias apresentaram redução da esteatose hepática (Sanches et al. 2016). Resultado semelhante foi demonstrado por França et al. (2019), onde o tratamento de ratos obesos-MSG com o extrato por um período de 8 semanas, nas doses de 0,5 e 1,0 g/kg, foi capaz de reverter a esteatose hepática desses animais. A adição do pó das sementes a dieta de animais com obesidade

induzida por dieta rica em açúcar e gordura também promoveu a diminuição da esteatose hepática (Ulla et al. 2017).

Como demonstrado por Chagas et al. (2015), há vários compostos fenólicos identificados *S. cumini* que podem atuar melhorando distúrbios metabólicos citados acima (Chagas et al. 2015). Considerando os flavonoides já identificados, o efeito anti-hiperglicêmico da rutina foi atribuído a sua capacidade de inibir a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose no fígado e no músculo de ratos com diabetes induzida por STZ (Prince and Kamalakkannan, 2006). Em outro estudo, a rutina foi capaz de aumentar a secreção de insulina em ilhotas de ratos diabéticos (**Figura 7**) (Esmaeili, Zohari, and Sadeghi 2009). A quercetina tem efeito sobre a homeostase de glicose, tanto por induzir a secreção de insulina pelas células  $\beta$  (**Figura 7**) (Bardy et al. 2013) como também por contribuir com a melhora da sensibilidade insulínica periférica através do aumento das concentrações plasmáticas de adiponectina em animais com obesidade induzida por dieta rica em gordura (Wein et al. 2010). Além disso, a quercetina mostrou efeitos protetores ao diminuir o estresse oxidativo com a preservação da integridade das células  $\beta$  pancreáticas no diabetes induzido por STZ em ratos (Coskun et al. 2005).



**Figura 7. Compostos polifenólicos identificados no *Syzygium cumini* e seus possíveis mecanismos de ação sobre a síndrome metabólica.** A quercetina e rutina podem diminuir a hiperglicemia pelo estímulo da secreção de insulina através do bloqueio de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L nas células- $\beta$  pancreáticas. Além disso, a rutina contribui através da inibição da produção hepática de glicose por aumentar a atividade da hexoquinase e diminuir a frutose-1,6-bifosfatase no fígado. A miricetina melhora a sensibilidade insulínica periférica por aumentar a expressão de GLUT-4 no tecido adiposo branco. Ácido gálico, quercetina e rutina diminuem a síntese de colesterol por inibirem a HMG-CoA redutase hepática. Além desses efeitos, a atividade antioxidante característica desses compostos e do *S. cumini* pode ser determinante para melhora das alterações glicêmicas e lipídicas observada na síndrome metabólica. Fonte: Chagas et al. (2015) com modificações.

O polifenol mais prevalente nas folhas de *S. cumini* é a miricetina (Chagas et al. 2015).

A ação anti-hiperglicemiante desse polifenol está associada ao seu efeito no aumento da expressão de GLUT4 no músculo esquelético e tecido adiposo branco (Figura 7) (Liu et al. 2007), como também ao seu efeito antioxidante responsável pela proteção das células  $\beta$  pancreáticas contra a apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias (Baldissera et al. 2016). Chang et al. (2012) demonstrou o efeito da miricetina em induzir o aumento da expressão de PPAR- $\alpha$  no fígado, estimulando, assim, a oxidação lipídica (Chang et al. 2012). Outros

polifenóis presentes em várias partes dessa espécie como o ácido gálico (Punithavathi et al. 2011), ácido elágico (Kannan and Quine 2013) e quercetina (Bok et al. 2002) podem inibir a 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) redutase hepática, enzima limitante da síntese de colesterol (Bjorkhem et al. 2013) (**Figura 7**).

Devido à variedade de compostos fenólicos já identificados no extrato de *S. cumini*, tanto das sementes quanto das folhas, fica evidente o seu potencial antioxidante. Estudos *in vitro* já comprovaram a capacidade *scavenger* desse extrato em relação a compostos radicalares como o DPPH e ABTS+ (Aqil et al. 2012; Sanches et al. 2016). A administração oral do extrato aquoso das sementes em camundongos tratados com uretano 7,12-dimetil benzotraceno, promoveu a redução da peroxidação lipídica como também aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (Arun et al. 2011a). Já o extrato metanólico dos frutos administrado em ratos tratados com ciclofosfamida, reduziu a formação de malondialdeído hepático e aumentou os níveis de glutathiona reduzida (Tripathi et al. 2013). Em estudo realizado com o pó das sementes de *S. cumini*, adicionados a dieta de ratos com obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura, foi observada a redução de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico hepático (TBARS), como também o aumento das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona reduzida (GSH) (Ulla et al. 2017).

Alguns estudos com extratos ricos em polifenóis demonstraram a capacidade destes em modular a microbiota intestinal de animais alimentados tanto com dieta rica em gordura quanto em açúcar (Anhe et al. 2015; Henning et al. 2018; Wang, Tang, et al. 2018). Resultado semelhante foi observado em estudo com humanos (Moreno-Indias, Sanchez-Alcoholado, et al. 2016). A modulação da microbiota por esses extratos foi particularmente associada a redução do número de bactérias do filo Firmicutes. As bactérias pertencentes a este filo foram associadas a um perfil obesogênico nos primeiros estudos com modelos animais de obesidade (Ley, Backhed, et al. 2005; Turnbaugh et al. 2007) e também em estudos com humanos (Ley et al.

2006; Furet et al. 2010). Além disso, esses estudos evidenciaram que a modulação da microbiota intestinal foi associada a melhora de parâmetros metabólicos como a redução da inflamação sistêmica e aumento da sensibilidade insulínica hepática (Anhe et al. 2015; Lee et al. 2018), diminuição da esteatose hepática (Anhê et al. 2018; Lee et al. 2018).

Outro efeito desses extratos ricos em polifenóis demonstrados nesses estudos, foi associado a uma maior proliferação de bactérias como *Akkermansia muciniphila* e espécies dos gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Essas espécies são reconhecidas como probióticas, ou seja, benéficas ao hospedeiro por serem consideradas importantes para a manutenção do efeito de barreira proporcionado pelo epitélio intestinal (Moreno-Indias, Sanchez-Alcoholado, et al. 2016; Anhe et al. 2018), para o controle da proliferação de espécies patogênicas (Fandriks 2017) e também estão associadas ao aumento das concentrações de AGCC (Bialonska et al. 2010). Por essa capacidade de favorecer a proliferação de bactérias benéficas, os polifenóis vêm sendo considerados como prebióticos (Fandriks 2017).

Apesar de haver alguns estudos que indiquem por quais mecanismos hepáticos ou adipocitários o extrato hidroalcoólico (EH) de *S.cumini* possa estar agindo (Sharma, Balomajumder, and Roy 2008b), há uma grande probabilidade de que sua atuação possa ser pela modulação da microbiota intestinal, uma vez que o extrato tem uma grande presença de compostos fenólicos, os quais possuem essa propriedade, já evidenciada em experimentos com extratos ricos em polifenóis, descritos acima.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o potencial efeito modulador do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (EH) sobre a composição da microbiota intestinal e a sua possível influência no eixo intestino-fígado de ratos alimentados com dieta rica em sacarose (HSD).

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar o efeito do tratamento com o EH sobre a evolução ponderal, consumo de ração e índice de Lee em ratos HSD, assim como, a morfologia e conteúdos lipídico e de glicogênio do fígado desses animais;
- Avaliar os níveis séricos glicêmico, lipídico e hormonais (insulina), a sensibilidade à ação da insulina e a acetilação total de proteínas do fígado de ratos HSD tratados com o EH;
- Verificar se o tratamento crônico com o EH modula a composição da microbiota intestinal, os níveis de AGCC nas fezes e o eixo intestino-fígado dos animais HSD;



## CAPÍTULO I

Review Article

### **Prebiotic effects of plant-derived (poly)phenols on host metabolism: Is there a role for short-chain fatty acids?**

Authors

Perla Lopes de Freitas<sup>1,2</sup>, Marcus Vinícius Câmara Barros<sup>1</sup>, Rômulo Brênno Lopes Fróes<sup>1</sup>, Lucas Martins França<sup>1</sup>, and Antonio Marcus de Andrade Paes<sup>1,2\*</sup>.

Affiliations

1. Laboratory of Experimental Physiology (LeFisio), Department of Physiological Sciences, Biological and Health Sciences Center, Federal University of Maranhão, São Luís (MA), Brazil.
2. Health Sciences Graduate Program, Biological and Health Sciences Center, Federal University of Maranhão, São Luís (MA), Brazil.

\*Corresponding Author

Paes, A.M.A., PhD.

E-mail: [marcuspaes@ufma.br](mailto:marcuspaes@ufma.br)

Phone: +55 (98) 3272 8557

Total word count: 12,506

Revista: Critical Reviews in Food Science and Nutrition

Fator de Impacto: 7.862 (2019)

**Abstract**

The gut microbiota has been extensively investigated during the last decade because of its influence on host neuroendocrine pathways and beyond. The imbalance between beneficial and pathogenic bacteria, known as dysbiosis, can be a determinant predisposing factor for many non-communicable chronic diseases, such as obesity, type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, and Alzheimer's disease. On the other hand, interventions aiming to reestablish the balance between microbiota components have been suggested as potential preventive therapeutic strategies against such disorders. Among them, dietary supplementation with (poly)phenols has been highlighted due to modulatory effects exerted by those compounds on gut microbiota. In addition, (poly)phenols consumption has been associated with increased production of short-chain fatty acids (SCFAs), a set of microbial metabolites whose actions are ascribed to improve the abovementioned metabolic disorders. Thus, this review discusses the modulation of the gut microbiota by prebiotic (poly)phenols based on *in vivo* studies performed with isolated (poly)phenolic compounds, their interaction with gut microbiota and the production of SCFAs as a possible mediating mechanism underlying the health effects provided by (poly)phenols on host metabolism.

**Key-words:** gut microbiota; prebiotics, (poly)phenols; short-chain fatty acids.

## 1. Introduction

During the last decade, consistent evidence has supported a capital role for gut microbiome on the host neuroendocrine homeostasis by regulating crucial aspects, such as nervous system development, energy balance as well as hormones and neurotransmitters synthesis (Wang and Wang 2016; Martinez, Pierre, and Chang 2016; Baothman et al. 2016). Gut microbiota is composed of a range of microorganisms – including bacteria, fungi, archaea and viruses – with a predominance of bacteria pertaining to four main phyla: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Proteobacteria (Human Microbiome Project 2012). These microorganisms generally live in symbiosis with their host, contributing to its homeostasis maintenance through the provision of nutrients, such as vitamins and amino acids, besides the breaking down of polysaccharides into smaller molecules of easier absorption (Shabana, Shahid, and Irfan 2018). However, the consumption of energy-dense and ultra-processed foods as well as the indiscriminate use of antibiotics have been shown to promote dysbiosis, which is an imbalance between healthy and pathogenic microbial species that impairs host metabolic homeostasis (Li, Watanabe, and Kimura 2017). Consequently, changes to the gut microbiota have been associated with the pathogenesis of obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), metabolic syndrome (MetS) and Alzheimer's disease (Brahe, Astrup, and Larsen 2016; Zhao, Dua, and Lukiw 2015).

Among the metabolites derived from colonic microorganisms, short-chain fatty acids (SCFAs) – acetate, propionate and butyrate – predominate as end products from fermentation of dietary non-digestible carbohydrates, such as vegetable fibers (Tan et al. 2014). Animal studies suggest that SCFAs play a key role in the prevention and treatment of obesity and its associated metabolic disorders (Henning et al. 2018; Gao et al. 2009; Lin et al. 2012), in spite of discordant findings in the literature. A recent study showed that increased production of acetate by an impaired gut microbiota is an early event in the etiology of MetS (Perry et al.

2016). In contrast, 12-week SCFAs supplementation to high-fat diet-induced obese mice mitigated most of MetS-associated outcomes (den Besten et al. 2015). Furthermore, there is human evidence that dietary supplementation with vegetable fibers improves body weight control and insulin sensitivity by modulation of gut microbiota composition (Vulevic et al. 2013) and increase of SCFAs circulating levels (Daud et al. 2014; Cani et al. 2009).

Increasing evidence has supported dietary interventions as a tool to modulate the gut microbiota composition in order to promote health through microbial-based therapeutic strategies (Sanders et al. 2019; Liu, Cao, and Zhang 2015). Such interventions are mainly based on the use of both probiotics and prebiotics. According to the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, probiotics are defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Hill et al. 2014), while prebiotics are defined as “a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit” (Gibson et al. 2017). Currently accepted prebiotics are non-digestible polysaccharides fructans and galactans, but other substances such as polyunsaturated fatty acids and (poly)phenols (Gibson et al. 2017). Probiotics are no longer simply promoters of healthy microorganisms’ growth, but also need to promote microbial production of metabolites recognized as having mechanistic links to health outcomes, such as the SCFAs (Gibson et al. 2017).

In this context, plant-derived (poly)phenols have emerged as a class of compounds potentially able to meet the criteria for prebiotics. Dietary (poly)phenols are poorly absorbed in the small intestine, leading them to reach the colon where they are extensively metabolized by the colonic microbiota (Clifford 2004). Notwithstanding, SCFAs have been shown to be mostly generated in the colon (humans) and caecum (rodents) (Gibson et al. 2017), corroborating consistent studies showing that health benefits associated with (poly)phenols consumption depend on their microbial utilization and the metabolites produced, rather than

on the compounds originally ingested (Cardona et al. 2013; Williamson and Clifford 2017; Duenas et al. 2015). Thus, this review describes the current understanding of the relationship between prebiotic (poly)phenols and its modulatory effect on microbiota composition, seeking the hypothesis that SCFAs production would be an underlying mechanism for the health benefits of plant-derived (poly)phenols on metabolic disorders.

## **2. Development of gut microbiota**

The human being has evolved as a holobiont entity, i.e., a unique ensemble of the human body and all the microbial communities that inhabit its surface and cavities, making the microbiota an evolutionary shaper of all aspects of human biology (Ley et al. 2008; Rook et al. 2017). Indeed, the proportion between human cells and inhabiting microorganisms is currently estimated in 1:1 (Sender, Fuchs, and Milo 2016). Among the various microbial niches in the body, the highest amount and diversity of commensal microorganisms is found in the gastrointestinal tract, particularly the colon where bacterial density ranges from  $10^8$  to  $10^{11}$  bacteria per gram of wet stool (Turnbaugh et al. 2007; Sender, Fuchs, and Milo 2016).

For over a century, based on the postulations made by the French pediatrician Henry Tissier, it was assumed that newborns were sterile because of the placental barrier and the initial gut colonization only occurred upon birth (Stinson, Payne, and Keelan 2017). However, the detection of maternal microbial species in the meconium (Jimenez et al. 2008) and amniotic fluid (Oh et al. 2010) has suggested the translocation of some microorganisms into the fetal bloodstream during gestation. In spite of that, the labour represents the main way of vertical microbiota transmission and the type of birth, i.e. if natural or C-section, strongly impacts on the offspring microbiota. Newborns exposed to vaginal microbes will present microbiome rich in *Lactobacillus* and *Prevotella* spp (Dominguez-Bello et al. 2010). On the other hand, the microbiome of those born via C-section is more prevalent in *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, and *Propionibacterium* spp., which resemble microbial species commonly

found in the skin (Backhed et al. 2015; Dominguez-Bello et al. 2016). During the first 3 years of life the gut microbial diversity expands exponentially until it reaches similar levels to those found in adults (Brahe, Astrup, and Larsen 2016). However, the composition at adulthood will depend on diverse factors, such as length of breastfeeding, early introduction of dietary sugars and use of antibiotics (Kundu et al. 2017).

At adulthood, an individual's gut microbiota contains around 160 out of the 1,000 – 1,150 distinct commensal species already identified by the European Metagenomics of the Human Intestinal Tract Study (European MetaHIT), supporting a wide inter-individual variability of microbiota composition (Qin, Li, Raes, Arumugam, Burgdorf, Manichanh, Nielsen, Pons, Levenez, Yamada, Mende, Li, Xu, Li, Li, Cao, Wang, Liang, Zheng, Xie, Tap, Lepage, Bertalan, Batto, Hansen, Le Paslier, Linneberg, Nielsen, Pelletier, Renault, Sicheritz-Ponten, Turner, Zhu, Yu, Li, Jian, Zhou, Li, Zhang, Li, Qin, Yang, Wang, Brunak, Dore, et al. 2010). Most of those species pertain to the phyla Firmicutes and Bacteroidetes, followed by Actinobacteria, Proteobacteria and Verrucomicrobia in lesser diversity (Eckburg et al. 2005; Lloyd-Price, Abu-Ali, and Huttenhower 2016). Besides inter-individual variability, the proportional ratio among those species also varies within individual lifetime (Yatsunenکو et al. 2012), to which dietary pattern seems to be a major contributing factor. For instance, microbiome diversity in western populations is 15 – 30% smaller than in non-western ones, with higher prevalence of Firmicutes and Proteobacteria in opposition to Bacteroidetes in the latter (Human Microbiome Project 2012; Qin, Li, Raes, Arumugam, Burgdorf, Manichanh, Nielsen, Pons, Levenez, Yamada, Mende, Li, Xu, Li, Li, Cao, Wang, Liang, Zheng, Xie, Tap, Lepage, Bertalan, Batto, Hansen, Le Paslier, Linneberg, Nielsen, Pelletier, Renault, Sicheritz-Ponten, Turner, Zhu, Yu, Li, Jian, Zhou, Li, Zhang, Li, Qin, Yang, Wang, Brunak, Dore, et al. 2010; Davenport et al. 2017). Nevertheless, other factors such as use of antibiotics and environmental pattern may also play a role on the gut microbiota composition (Tamburini et

al. 2016). In a whole, these factors may ultimately disrupt the symbiotic host-microbiota relationship, which results in dysbiosis (Li, Watanabe, and Kimura 2017).

### **3. Dysbiosis and metabolic disorders**

Inflammation is well-characterized as a common factor underlying the etiology of most metabolic disorders, particularly those affecting the metabolic quartet: liver, pancreas, white adipose tissue and skeletal muscle (Wellen and Hotamisligil 2005; Shoelson, Lee, and Goldfine 2006; Bruun et al. 2006). However, mechanisms interconnecting these apparently far tissues started to be elucidated only recently. In a seminal study, Cani and colleagues (Cani et al. 2007) showed that mice fed a high-fat diet for 4 weeks presented lipopolysaccharide (LPS) plasma levels increased by 2 – 3 times, which was associated to body weight gain, insulin resistance onset and white adipose tissue dysfunction. Such findings led the authors to characterize LPS rising as the trigger factor of the so-called metabolic endotoxemia (Cani et al. 2007). LPS is a well-studied inducer of inflammation, which is continuously produced in the gut by the lysis of Gram-negative bacteria and physiologically translocated into intestinal capillaries through a TLR4-dependent mechanism (Neal et al. 2006). Metabolic endotoxemia has also been demonstrated in genetically obese mice (Everard et al. 2011; Brun et al. 2007) and humans (Pussinen et al. 2011; Hawkesworth et al. 2013). Therefore, increased LPS circulating levels started to be considered an important dysbiosis marker.

Early studies have shown that obese rodents present an increase of bacteria from Firmicutes phylum in parallel to a decrease of those from Bacteroidetes (Ley, Backhed, et al. 2005; Turnbaugh et al. 2007), as well as *Akkermansia* species (Everard et al. 2013). In humans, data have been controversial by showing the same pattern found in animals (Furet et al. 2010; Ley et al. 2006) or the very contrary (Armougom et al. 2009; Schwiertz, Taras, Schafer, et al. 2010). Interestingly, it was demonstrated the prevalence of microbes from

Firmicutes and Proteobacteria phyla in the gut microbiota of European children exposed to western diet, while African children fed a rural diet presented higher proportion of Bacteroidetes and Actinobacteria (De Filippo et al. 2010). Thus, as a quasi-consensus, it has been accepted that metabolic disorders are associated with shifts in the microbiota at phylum level, which promote the increase of Firmicutes/Bacteroidetes ratio (Cani 2018). Additionally, current studies have transcended the matter of microbiota composition to shed light on microbiota-derived metabolites, such as the SCFAs, trimethylamine N-oxide and imidazole propionate (Cani 2019; Rastelli, Knauf, and Cani 2018).

#### **4. Short-chain fatty acids and their metabolic effects**

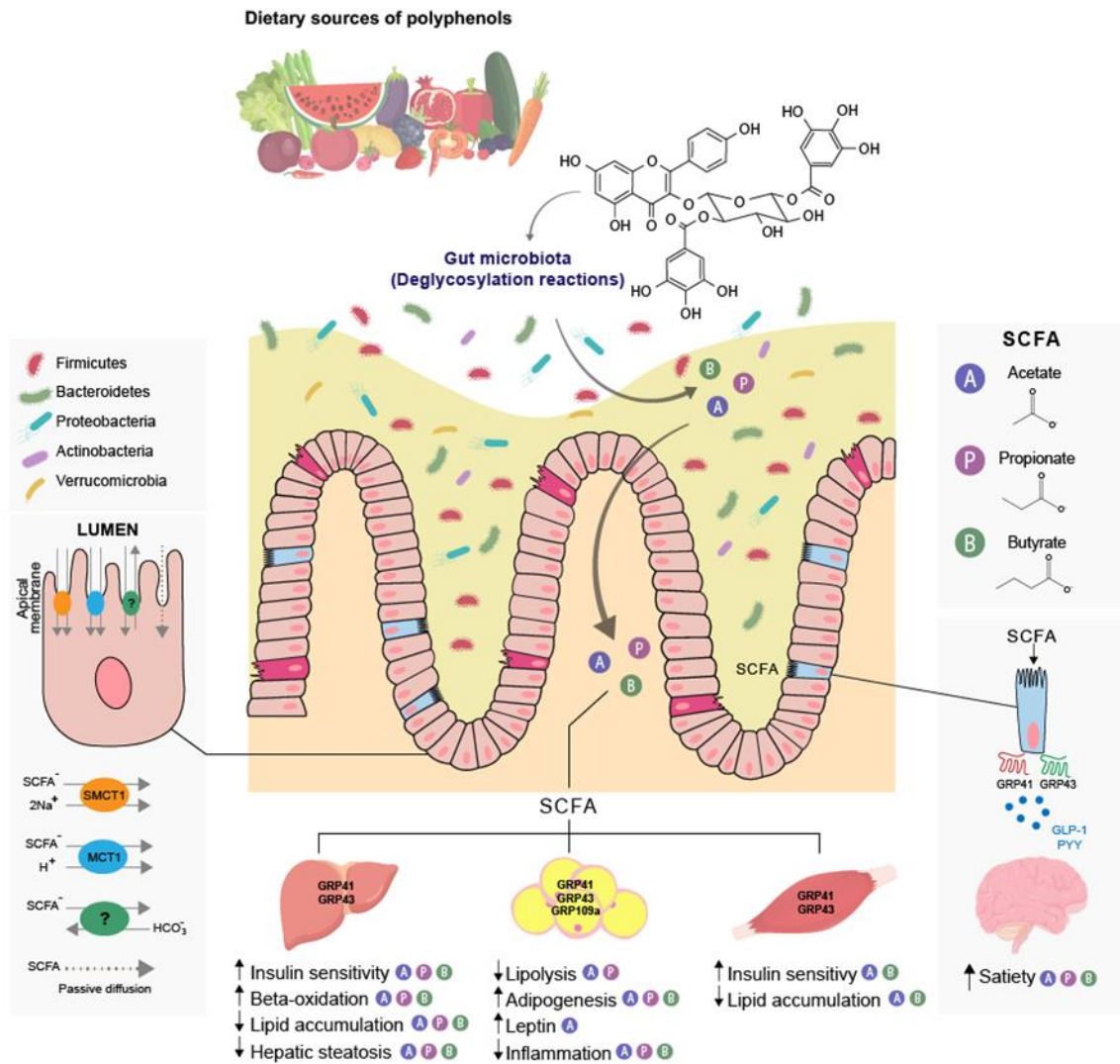
SCFAs are carboxylic acids defined by the presence of an aliphatic tail varying from two to six carbons – namely: acetate (C2), propionate (C3), butyrate (C4), valerate (C5) and caproate (C6) – whose major site of production is the colonic microbiota (Tan et al. 2014). SCFAs production also results from lipid oxidation during starvation-derived ketosis, as well as acetyl-CoA hydroxylase action during branched chain amino acids catabolism, though to a lesser extent (Tan et al. 2014). Thus, SCFAs are mostly released from deglycosylation reactions during microbial fermentation of vegetable fibers and resistant starches, reaching the highest concentration in the proximal colon (70–140 mM), followed by distal colon (20–70 mM) and distal ileum (20–40 mM) (Gill et al. 2018; Wong et al. 2006) (Figure 1). Approximately 36% of acetate, 9% of propionate and 2% of butyrate released by colonic microbiota reaches the blood stream (Boets et al. 2017).

Most of SCFAs production in bacteria is via the glycolytic pathway, although some phyla such as the Bifidobacteria can utilize the pentose phosphate pathway to produce the same metabolites (Tan et al. 2014). The oxygen-sensitive Wood-Ljungdahl pathway is the most efficient acetate generating mechanism in “acetogens” bacteria, which mainly pertain to the Firmicutes phylum (Ragsdale and Pierce 2008). Propionate is produced from both



succinate via methylmalonyl-CoA conversion and lactate reduction via acrylate by bacteria pertaining to the Bacteroidetes and Negativicutes phyla as well as *Clostridium* genus (Miller and Wolin 1996). On its turn, butyrate is formed from two acetyl-CoA molecules via the classical phosphotransbutyrylase and butyrate kinase pathway or the alternate acetyl-CoA transferase pathway (Louis and Flint 2009). The major groups involved in the production of butyrate are of the *Cytophaga* and *Flavobacterium* group, which belong to the Bacteroidetes phylum (Tan et al. 2014), though some Firmicutes species, e.g. *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia* spp, have also been shown to produce butyrate (Duncan et al. 2002).

Once produced in the colon, SCFAs are promptly absorbed into the interstitial fluid via a family of active transporters, namely monocarboxylated transporters (MCTs) (Figure 1). MCT1 transports uncharged SCFAs in an H<sup>+</sup>-dependent manner, meanwhile SCFA anionic forms are transported by the electrogenic sodium-dependent MCT1 (SMCT1). SCFAs absorption through passive diffusion is virtually possible but thought to be of less importance. A recent seminal review paper by Stumpff (2018) has thoroughly reviewed the biophysics of SCFAs transport. SCFAs effects on host metabolism are mediated by a set of G-protein-coupled receptors (GPCRs) also known as free fatty acids receptors 2 (FFAR2/GPR43) and 3 (FFAR3/GPR41). GPR41 has higher affinity for propionate, followed by butyrate and acetate, whereas GPR43 is equally activated by either acetate or propionate. Both receptors are expressed in the colon epithelium, white adipose tissue, liver and skeletal muscle, while only GPR41 has been found in the peripheral nervous system (Brown et al. 2003). More recently, the butyrate-only responsible receptor GPR109a, also known as hydrocarbolylic acid receptor 2, was described in enterocytes, adipocytes and immune cells (Thangaraju et al. 2009) (Figure 1).



**Figure 1. Polyphenols – gut microbiota interaction and its impact on host metabolism.** Polyphenols are secondary metabolites widely distributed in fruits, vegetables and other plant-based foods in glycosylated form. At the colon, polyphenols not absorbed in the small intestine are catabolized by distinct bacteria phyla pertaining to gut microbiota. Those bacteria deglycosylate complex polyphenols to deliver bioactive compounds, which modulate the microbiota by inhibiting harmful and stimulating beneficial bacteria through the biosynthesis of microbial metabolites, such as the short chain fatty acids (SCFA). Acetate, propionate and butyrate are the most abundant SCFA at human distal colon, where they are rapidly absorbed by colonic cells via monocarboxylate transporters (MCT1 and SMCT1), passive diffusion or ion-exchange with bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Once in the interstitial fluid, SCFA bind to GPR41 and GPR43 receptors, leading to the secretion of the gut-derived satiety hormones PYY and GLP-1, whereas smaller amounts reach the blood stream to promote metabolic effects on peripheral tissues, such as liver, adipose tissue, and skeletal muscles. Abbreviations: MCT1, monocarboxylate transporter 1; SMCT1, sodium-dependent monocarboxylate transporter 1; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GRP, G-protein coupled receptor; PYY, peptide YY.

Butyrate is particularly active on white adipose tissue and lipid metabolism. Butyrate has been shown to increase lipolytic activity in human adipose tissue-derived stem cells (Jocken et al. 2017) and murine 3T3-L1 adipocytes (Rumberger, Arch, and Green 2014). Likewise, dietary butyrate given to high-fat-fed mice increased fatty acids oxidation, improved thermogenesis and energy expenditure, as well as improved insulin sensitivity (Gao et al. 2009). Lipolytic properties of butyrate have been ascribed to its inhibitory effect on histone deacetylases (HDACs), which remove acetyl groups from histones and, consequently, interfere with a large number of genes expression (Rumberger, Arch, and Green 2014). Besides butyrate, propionate has also been associated to HDAC inhibition. Both SCFAs strongly increase the expression of intestinal peptide YY (PYY) in human entero-endocrine cell lineages (NCI-h716 e HuTu-80) seemingly through HDAC inhibition (Larraufie et al. 2018).

Propionate has been characterized as a main substrate of both hepatic and intestinal gluconeogenesis (De Vadder et al. 2014; den Besten, van Eunen, et al. 2013). Rats fed a propionate-enriched diet showed increased intestinal gluconeogenesis and improved glucose homeostasis via gut-brain neural circuits involving GPR41 activation (De Vadder et al. 2014). Similarly, propionate infusion into rats and mice colon stimulated glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and PYY secretion from intestinal L-cells seemingly through GPR43-dependent pathways (Psichas et al. 2015). The association between propionate and GLP-1 secretion via GPR43 activation had been previously suggested due to the marked decrease of propionate-induced GLP-1 secretion in *ffar2*<sup>-/-</sup> mice (Tolhurst et al. 2012). In humans, administration of inulin-propionate, which delivers free propionate upon gut microbiota metabolism, also increased colonic and plasma levels of GLP-1 and PYY, leading to reduction of both body weight and liver steatosis, as well as improved insulin sensitivity (Chambers et al. 2015).

Acetate is metabolized in virtually all tissues because of its nature as a substrate for Krebs cycle (Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, and Backhed 2016). Similar to propionate, acetate has also been implicated in the modulation of satiety via secretion of PYY (Freeland and Wolever 2010; Tolhurst et al. 2012; van der Beek et al. 2016) and GLP-1 (Aoki et al. 2017). In addition, Frost et al. (2014) demonstrated that acetate crosses the blood-brain barrier and directly stimulate hypothalamic nuclei responsible for appetite control by increasing pro-opiomelanocortin (POMC) and decreasing Agouti-related peptide (AgRP) expressions, causing body weight loss in obese rodents (Frost et al. 2014). This weight-loss effect of acetate has been further supported by others (Lu et al. 2016; Yamashita et al. 2007). Contrary to these observations, an elegant study conducted by Perry et al. (2016) demonstrated that the gut microbiota-derived acetate stimulates hyperphagia and body weight gain in high-fat-fed mice via direct stimulus of the nucleus tractus solitarius and subsequent hyperinsulinemia caused by augmented parasympathetic firing (Perry et al. 2016).

The role of GPR41, GPR43 and GPR109a as mediators of SCFAs metabolic effects is still relatively recent. In spite of the abovementioned body of evidence, the variety of SCFAs physiologic functions imposes the question of whether those receptors are the only targets to be considered in the design of SCFAs-based therapeutic strategies. Moreover, contradictory data among quite similar approaches have resulted in challenging data interpretation, which demands further characterization of additional signaling pathways triggered by SCFAs.

### **5. Modulatory effects of plant-derived (poly)phenols on gut microbiota**

(Poly)phenols constitute a large group of phytochemical compounds naturally found in vegetables, fruits and derived products, such as chocolate, coffee, wine and tea (Farhat, Drummond, and Al-Dujaili 2017). Around 8,000 distinct phenolic compounds have been identified so far, which may be split into two main groups: flavonoids and non-flavonoids, such as stilbenes, phenolic acids, and catechins (Tsao 2010). Human dietary intake of

(poly)phenols is estimated in at least 1g per day. However, the absorption of (poly)phenols from the small intestine is very limited (Manach et al. 2005). The vast majority (90-95%) of the ingested (poly)phenols, reach the colon where they are metabolized by microbes from the gut microbiota (Clifford 2004). (Poly)phenols metabolism by gut microbiota depends on deglycosylation, i.e., cleavage of glycoside bonds and heterocyclic backbone of parent compounds to generate absorbable bioactive metabolites (Ozidal et al. 2016) (Figure 1). Bacteria from Bacteroidetes phylum have been shown to express higher diversity of glycan-degrading enzymes than Firmicutes (Mahowald et al. 2009). Thus, increased concentrations of (poly)phenols in the colonic lumen are thought to drive the growth of Bacteroidetes, modulating the gut microbiota composition toward a healthier mix of microbes (Ozidal et al. 2016; Sanders et al. 2019; Liu, Cao, and Zhang 2015). These findings have grounded the classification of (poly)phenols as prebiotics (Gibson et al. 2017).

The appliance of the following descriptors combination: “microbiota and (poly)phenols” or “short-chain fatty acids and (poly)phenols” in Pubmed allowed the retrieval of over 500 studies published between 2008 and 2020. Two criteria for inclusion were applied: the use of pure, isolated (poly)phenols and the assessment of *in vivo* metabolism-related outcomes upon (poly)phenol treatment. Most of the studies retrieved were *in vitro* or based on the assessment of plant extracts, which did not make clear the compound responsible for the described effects. Only 31 studies used purified compounds pertaining to stilbenoids, flavonoids and capsaicinoids classes of (poly)phenols and therefore were considered appropriate (Table 1).

**Table 1. Effect of isolated (poly)phenols on gut microbiota, short-chain fatty acids production and host metabolic outcomes.**

(Poly)phenol	Model	Dose	Microbiota modulation	SCFA production	Metabolic outcomes	Refs.
<i>Stilbenes</i>						
Resveratrol	DSS-induced colitic rats	1 mg/kg/day supplemented to the diet for 25 days.	Increased both <i>Lactobacillus</i> spp. and <i>Bifidobacterium</i> spp., while decreased <i>Enterococcus faecalis</i> .	Not assessed	Reduced body weight loss associated to DSS-induced colitis.	Larrosa et al. (2009)
	HFD-fed mice	60 mg/kg/day supplemented to the diet for 5 weeks.	Reduced <i>Parabacteroides jonsonii</i> , <i>Alistipes putredinis</i> and <i>Bacteroides vulgatus</i> .	Not assessed	Improved glucose tolerance without affecting fasting glycemia and increased portal vein levels of GLP-1 and insulin, as well as GLP-1 intestinal content.	Dao et al. (2011)

HFD-fed mice	200 mg/kg/day supplemented to the diet for 12 weeks.	Increased Bacteroidetes, <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> , while reduced <i>Enterococcus faecalis</i> abundances.	Not assessed	Reduced body weight and epididymal adipose tissue mass, as well as fasting blood glucose levels, while improved fasting plasma HDL-C and LDL-C levels.	Qiao et al. (2014)
HFD-fed mice	200 mg/kg/day by oral gavage for 8 weeks.	Unchanged Firmicutes/Bacteroidetes ratio, but reduced <i>Lactococcus</i> , <i>Clostridium XI</i> , <i>Oscillibacter</i> , <i>Hydrogenoanaerobacterium</i> and <i>Flavonifractor</i> abundances.	Not assessed	Reduced body weight and epididymal adipose tissue mass, as well as improved glucose tolerance and insulin sensitivity.	Jung et al. (2016)
HFHS-fed mice	400 mg/kg/day supplemented to the diet for 8 weeks.	Increased Bacteroidetes-to-Firmicutes ratio, characterized by decreased <i>Turicibacteraceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , and <i>Akkermansia</i> , while increased <i>Bacteroides</i> and <i>Parabacteroides</i> abundances.	No changes in faecal SCFA acylcarnitines.	Decreased fat mass but not body weight, while improved glucose tolerance.	Sung et al. (2017)

HFD-fed mice	35 mg/kg/day (roughly) supplemented to the diet for 8 weeks*.	Restored Bacteroidetes-to-Firmicutes ration, reduced Proteobacteria and increased <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> abundances.	Not assessed	Reduced body weight gain and fat mass accumulation, as well as improved glucose homeostasis.	Liao et al. (2018)
HFD-fed mice	400 mg/kg/day supplemented to the diet for 16 weeks.	Marked increase in <i>Erysipelotrichiceae</i> family and <i>Allobaculum</i> genus.	Not assessed	Reduced body weight and food intake but did not change subcutaneous and visceral fat pads.	Brandt et al. (2018)
Faecal transplantation from RSV-treated lean mice to HFD-fed mice	300 mg/kg/day by oral gavage for 16 weeks.	Increased Bacteroidetes and decreased Firmicutes, characterized by increased <i>Bacteroides</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Blautia</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Parabacteroides</i> , and <i>Ruminiclostridium</i> abundances.	Not assessed	Decreased body weight and adipose tissue fat pads but did not change energy intake. Improved insulin-glucose axis function and modulated lipid metabolism- and inflammation-related gene expression.	Wang, Li, et al. (2020)
High-Fructose-fed rats	50 mg/L in drinking water for 9 weeks.	Decreased Bacteroidetes, but increased <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> and <i>Akkermansia</i> abundances.	Not assessed	Increased body weight, prevented hypertension, reduced renal oxidative stress and activated nutrient-sensing signals.	Tain et al. (2018).



	HFD-fed mice	60 mg/kg/day supplemented to the diet for 5 weeks.	Increased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio, characterized by increased <i>Ruminococcaceae</i> and decreased <i>Rikenellaceae</i> and <i>Peptostreptococcaceae</i> abundances. Additionally, reduced the proportion of Proteobacteria.	Not assessed	Attenuated glucose intolerance.	Sreng et al. (2019)
	HFD-fed rats	10mg/kg/day supplemented to the diet for 8 weeks.	Increased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio, characterized by increased <i>Lachnospiraceae</i> and decreased <i>Bacteroides</i> and <i>Desulfovibrionaceae</i> abundances.	No changes in faecal SCFA	No changes in body weight and food intake, but decreased plasma glucose levels and improved peripheral insulin sensitivity.	Yang, Deng, et al. (2019).
Trans-resveratrol	Humans	2g/day (roughly) orally for 30 days.	Decreased <i>Rikenellaceae</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Oscillospira</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Alistipes</i> , <i>Odoribacter</i> , and <i>Butyricimonas</i> , as well as increased <i>Gemellaceae</i> , <i>Turicibacter</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> , and <i>Akkermansia</i> .	Not assessed	No changes in MetS-related outcomes but a slight improvement of glucose tolerance, particularly in Caucasian subjects.	Walker et al. (2019)

Trans-resveratrol + Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	Humans	80 mg/day RVS and 282 mg/day EGCG orally for 12 weeks.	Decreased Bacteroidetes and tended to decrease <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> abundances in men but not women.	Not assessed	No changes in energy intake, but increased fat oxidation and skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity.	Most et al. (2017)
Pterostilbene	Zucker ( <i>fa/fa</i> ) rats	15 mg/kg/day supplemented to the diet for 6 weeks.	Decreased Firmicutes phylum, characterized by decreases in <i>Negativicutes</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>DeFluviitaleaceae</i> , but increased <i>Mollicutes</i> . Additionally, Bacteroidetes phylum was not changed, while Verrucomicrobia phylum was increased.	Not assessed	Reduced body weight gain and adipose tissue accumulation, as well as improved insulin homeostasis.	Etxeberria et al. (2017)

---

### Flavonoids

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	Chow-fed rats	200 mg and 400 mg/kg/day supplemented to the diet for 4 weeks*.	Decreased <i>Bifidobacterium</i> , <i>Prevotella</i> and <i>Clostridium</i> spp., as well as increased <i>Bacteroides</i> abundances.	Decreased acetate and butyrate, but did not change propionate caecal levels.	No changes in MetS-related outcomes but reduced perirenal fat pad and liver weight.	Unno, Sakuma, and Mitsuhashi (2014).
	Chow-fed mice	100 mg, 1500 mg, or 3000 mg/kg/day supplemented to the diet for 2, 7, or 10 days*.	Decreased <i>Clostridium</i> cluster IV and <i>Clostridium</i> cluster XIVa abundances upon 2 and 10 days of treatment.	Not assessed	No changes in MetS-related outcomes but decreased CYP3A gene expression in the liver.	Ikarashi et al. (2017)

	HFD-fed mice	33 mg/kg/day (roughly) supplemented to the diet for 8 weeks*.	Decreased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio, characterized by increased abundances of <i>Adlercreutzia</i> , <i>Akkermansia</i> , <i>Allobaculum</i> , <i>Clostridium</i> and <i>Parabacteroides</i> , as well as decreased <i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> and <i>Ruminococcous</i> abundances.	Not assessed	Suppressed body weight gain and hepatic steatosis with no change in food intake.	Ushiroda et al. (2019)
Quercetin	HFD-fed mice	50 mg/kg/day aglycone quercetin supplemented to the diet for 16 weeks*.	Increased Bacteroidetes-to-Firmicutes ratio, characterized by increased <i>Bacteroidia</i> , <i>Erysipelotrichi</i> and <i>Betaproteobacteria</i> and decreased <i>Deltaproteobacteria</i> , <i>Bacilli</i> and <i>Clostridia</i> abundances. Moreover, reduced <i>Desulfovibrio</i> and <i>Helicobacter</i> genera, as well as increased <i>Akkermansia</i> abundances.	Increases of 34% in acetate, 27% in propionate, and 21% in butyrate caecal levels.	Reduced body weight gain and adipose tissue accumulation, as well as improved glucose-insulin axis function, lipid metabolism and liver steatosis with no changes in food intake.	Porras et al. (2017).
Hesperetin	Chow-fed rats	360 mg/kg/day supplemented to the diet for 3 weeks*.	Decreased <i>Clostridium</i> subcluster XIVa, but increased clusters IV and XVIII abundances.	Increased acetate and butyrate, but did not change propionate caecal levels.	Reduced abdominal adipose tissue accumulation.	Unno, Hisada, and Takahashi (2015)
Theaflavins	<i>db/db</i> mice	140 mg/kg/day supplemented to the diet for 7 weeks*.	Decreased <i>Barnesiella</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Odoribacter</i> and <i>Lachnospiraceae</i> abundances.	Not assessed	Decreased blood insulin levels at week 6.	Chen et al. (2019)

---

---

**Phenolic acids**

Sinapine	HFD-fed mice	6 mg/kg/day (roughly) rapeseed oil sinapine supplemented to the diet for 12 weeks*.	Decreased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio, characterized by increased <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Akkermansiaceae</i> , <i>Prevotellaceae</i> , <i>Eggerthellaceae</i> , <i>Blautia</i> , and <i>Bifidobacterium</i> , as well as decreased <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Peptostreptococcaceae</i> and <i>Desulfovibrio</i> abundances.	Not assessed	Reduced body weight, food efficiency, and adipose tissue accumulation; reversed dyslipidemia and hepatic steatosis; improved glucose-insulin axis function.	Li et al. (2019)
Hydroxytyrosol	Fine particulate matter-exposed mice	50 mg/kg/day by oral gavage for 4 weeks.	Tended to reduce Firmicutes and Actinobacteria but increase Bacteroidetes and <i>Akkermansia</i> abundances.	Not assessed	Mitigated visceral adipose tissue accumulation, restored glucose tolerance and insulin sensitivity, as well as ameliorated oxidative stress and inflammation markers in the liver.	Wang et al. (2019).
	HFD-fed mice	50 mg/kg/day by oral gavage for 8 weeks.	Unchanged Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio.	Not assessed		Liu et al. (2019)

---

**Others**

Capsaicin	Humans	0,078 mg/kg/day for 2 weeks, 1 week washout and than 0,156 mg/kg/day for 2 weeks*.	Increased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio, characterized by increased abundances of <i>Lachnospiraceae</i> and <i>Ruminococcaceae</i> families and <i>Faecalibacterium</i> genus.	Not assessed	No changes in MetS-related outcomes but increased plasma GLP-1 and GIP levels, as well as decreased plasma ghrelin levels.	Kang et al. (2016)
	HFD-fed mice	2 mg/kg/day supplemented to the diet for 12 weeks*.	Increased <i>Ruminococcaceae</i> and <i>Lachnospiraceae</i> families and decreased LPS-producing S24-7 family abundances.	Increased butyrate but did not change acetate and propionate faecal levels.	Reduced body weight gain and adipose tissue accumulation, as well as improved glucose tolerance. Additionally, reduced LPS-induced endotoxemia and proinflammatory cytokines serum levels.	Kang et al. (2017).
	HFD-fed mice	10 mg/kg/day supplemented to the diet for 9 weeks*.	Increased Acidobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes characterized by increased abundances of <i>Bacteroides</i> , <i>Coprococcus</i> and <i>Prevotella</i> genera; increased <i>Akkermansia</i> as well as decreased Proteobacteria abundance.	Not assessed	Reduced body weight gain and food intake, as well as improved glucose tolerance.	Shen, Shen, et al. (2017).

<i>ob/ob</i> mice	6 and 12 mg/kg/day supplemented to the diet for 6 weeks*.	Increased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio characterized by increased <i>Roseburia</i> , but decreased <i>Bacteroides</i> and <i>Parabacteroides</i> abundances.	Increased butyrate but did not change acetate and propionate faecal levels.	No changes in body weight, food and caloric intake, but improved glucose tolerance and insulin peripheral sensitivity.	Song et al. (2017)
<i>db/db</i> mice	Added to the diet at 0.01% for 4 or 8 weeks #.	Prevented the increase of Firmicutes but did not change Bacteroidetes abundances. Additionally, decreased <i>Lactobacillus</i> abundance.	Not assessed	No change in body weight neither white adipose tissue fat pads. Avoided the increase of fasting blood glucose and insulin levels, restored glucose tolerance and improved insulin peripheral sensitivity.	Hui et al. (2019).
HFD-fed TRPV1 <sup>-/-</sup> mice	2 mg/kg/day by oral gavage for 12 weeks	Increased Bacteroidetes, Tenericutes and Verrucomicrobia phyla, characterized by increased abundances of <i>Bacteroides</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Prevotella</i> and <i>Akkermansia</i> genera. Decreased Proteobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria and Firmicutes phyla, characterized by decreased abundances of <i>Sutterella</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Escherichia</i> , and <i>Helicobacter</i> genera, as well as endotoxemic S24-7 family.	Increased acetate and propionate but did not change butyrate faecal levels.	Reduced body weight gain and food intake, as well as lowered fasting TG, TC, HDL-C, LDL-C, glucose and insulin plasma levels.	Wang, Tang, et al. (2020).

Dihydrocapsiate	HFD-fed mice	2 and 10 mg/kg/day by oral gavage for 12 weeks	Decreased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio, but did not note change <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> and <i>Akkermansia</i> abundances.	Decreased acetate, propionate and butyrate faecal levels, but only butyrate in caecal content.	No change in body weight gain, food intake and white adipose tissue mass. Reduced serum TG and insulin levels, as well as improved glucose tolerance. Attenuated hepatic steatosis by improving insulin signaling, as well as transcriptional levels of thermogenesis and fatty acid $\beta$ -oxidation-related genes.	Baboota et al. (2018).
Honokiol	HFD-fed mice	200, 400 and 800 mg/kg/day supplemented to the diet for 8 weeks.	Increased <i>Akkermansia</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Bilophila</i> , <i>Unclassified_Enterobacteriaceae</i> , and <i>Fusobacterium</i> , but decreased <i>Muribaculaceae</i> , <i>Oscillospira</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Unclassified_Clostridiales</i> , <i>Unclassified_Ruminococcaceae</i> , <i>Lactococcus</i> , and <i>Dehalobacterium</i> abundances.	Increased acetate, butyrate and propionate caecal levels.	Reduced body weight and adipose tissue accumulation, improved dyslipidemia and glucose-insulin axis function, as well as reduced systematic inflammation.	Ding et al. (2019)

---

Resveratrol is the leading (poly)phenol in the microbiota-based studies herein described (Table 1). Chemically, resveratrol is a phenylalanine-derived (poly)phenol pertaining to a large, structurally diverse class of oligomeric stilbenoids. Resveratrol is present in wines and foods widely consumed, while its biological properties and health perspectives have caught the attention of dieticians, medicinal chemists, and health professionals (Rauf et al. 2017; Keylor, Matsuura, and Stephenson 2015). An inaugural study by Larrosa et al (2009) demonstrated that 25-day treatment with a low resveratrol dose (1 mg/kg/day) increased *Lactobacilli* and *Bifidobacterium*, as well as avoided the increase of *Enterobacteria* upon colitis induction. A total of 2,655 genes, mostly related to inflammatory pathways, were significantly regulated in distal colon mucosa upon resveratrol treatment (Larrosa et al. 2009). Dietary supplementation with resveratrol at a much higher dose (400 mg/kg/day) for 8 weeks increased the Bacteroidetes-to-Firmicutes ratio, particularly by increasing the growth of *Bacteroides* and *Parabacteroides* genera, which improved the gut microbiota dysbiosis of high-fat high-sugar-fed mice (Sung et al. 2017). On the other hand, administration of resveratrol, at the same dose of 400 mg/kg/day, during 16 weeks to HFD-fed mice rather increased the relative abundances of bacteria pertaining to Firmicutes, Proteobacteria and Verrucomicrobia phyla (Brandt et al. 2018). Interestingly, 6-week dietary supplementation of pterostilbene (15 mg/kg/day), a dimethoxy resveratrol derivative, to obese Zucker (*fa/fa*) rats led to reduction of Firmicutes phylum with no significant effect on Bacteroidetes, but increased profusion of Verrucomicrobia abundances (Etxeberria et al. 2017).

Very few studies have assessed the effects of resveratrol on human microbiota (Table 1). A recent pilot randomized, placebo-controlled clinical trial with 28 obese men receiving 2 g/day trans-resveratrol for 30 days found an increase in several taxa including *Akkermansia muciniphila*, an effect restricted to Caucasian subjects, whereas placebo controls showed no



significant differences in the taxa comparing the pre- and post-treatment specimens (Walker et al. 2019). On the other hand, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial including 37 overweight and obese men and women receiving a combination of epigallocatechin-3-gallate and resveratrol (282 and 80 mg/day, respectively) for 12 weeks showed that (poly)phenols supplementation significantly decreased Bacteroidetes and tended to reduce *F. prausnitzii* in men but not in women (Most et al. 2017). These studies importantly unveil the matter of sexual and ethnical influences on the individual response to (poly)phenols intake, besides the possible mutual antagonism among distinct phenols, which deserve more well-designed studies in the future.

Flavonoids constitute one of the most studied groups of (poly)phenols, whose structure is based on a 15-carbon skeleton of a chromane ring attached to a second aromatic ring. According to the side-chain substituents, flavonoids can be subdivided into groups, such as flavan-3-ols, flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, and anthocyanins (Fraga, Croft, Kennedy, and Tomas-Barberan 2019). However, despite the huge number of *in vitro* and cell-culture-based studies on the effects of flavonoids on microbiota-derived bacteria, we found scarce *in vivo* studies devoted to this phytochemical class. Epigallocatechin 3-gallate (EGCG), a flavan-3-ol compound, was the second most studied (poly)phenol in terms of microbiota modulation, followed by the flavonol quercetin and the flavanone hesperetin (Table 1).

EGCG is described to be particularly active against bacteria pertaining to Firmicutes phylum. Administration of EGCG at 200 or 400 mg/kg/day for 4 weeks to chow-fed rats strongly decreased the relative abundances of distinct *Clostridium* clusters (Unno, Sakuma, and Mitsuhashi 2014). Similarly, administration of EGCG at a very high dose of 3,000 mg/kg/day for 2 or 10 days almost abolished the colonies of *Clostridium* cluster IV and *Clostridium* cluster XIVa in stools from lean mice at both times (Ikarashi et al. 2017). In contrast, in HFD-fed mice, dietary supplementation with EGCG at 33 mg/kg/day for 8 weeks

increased relative abundances of *Clostridium* genus, although it had decreased other Firmicutes families, such as *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*, resulting in decreased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio (Ushiroda et al. 2019). In an elegant study by Porras et al, 16-week supplementation of a high-fat diet with 0.05% quercetin prevented the development of HFD-induced dysbiosis in mice (Porras et al. 2017). Of note, quercetin administration did not change the relative percentage of Firmicutes phylum, although it decreased Proteobacteria and increased Bacteroidetes, promoting a significant increment of Bacteroidetes-to-Firmicutes ratio (Porras et al. 2017). Other studies using hesperetin in chow-fed rats and theaflavins in diabetic *db/db* mice found rather conflicting data. Hesperetin decreased the relative abundance of *Clostridium* subcluster XIVa but increased those of clusters IV and XVIII (Unno, Hisada, and Takahashi 2015), whereas theaflavins decreased bacteria abundances in spite of the phyla they belong to (Chen et al. 2019).

Most (poly)phenols are catabolized by host microbiota to form phenolic acids, which are believed to be mainly absorbed by monocarboxylic acid transporters (Fraga, Croft, Kennedy, and Tomas-Barberan 2019; Murota, Nakamura, and Uehara 2018). Thus, phenolic compounds harboring a sole aromatic ring are also capable of modulating host microbiota. Sinapine, an anticholinesterase phenolic acid, has been shown to modulate the microbiota of HFD-fed mice. Dietary supplementation of sinapine (~ 6 mg/kg/day) for 12 weeks decreased the Firmicutes-to-bacteroidetes ratio, particularly by reducing the relative abundances of *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Peptostreptococcaceae* families (Li et al. 2019). Using an animal model of metabolic disruption caused by exposure to fine particulate matter ( $\leq 2.5 \mu\text{m}$ , PM), (Wang et al. 2019) demonstrated that oral administration of hydroxytyrosol (50 mg/kg/day) for 4 weeks to C57BL/6j mice slightly improved PM-induced dysbiosis by enhancing Bacteroidetes and reducing Firmicutes and Actinobacteria abundances. However, the same compound at the same dose administered by gavage to HFD-fed mice for 8 weeks

did not alter the Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio, but promoted some significant changes at family and genus levels (Liu et al. 2019) (Table 1). These studies importantly suggest that distinct environmental factors, such as fine particulate matter or fat-rich diets, disturb gut microbiota homeostasis in different ways, making a particular (poly)phenol more or less effective in accordance to the dysbiosis inducer.

Lastly but not least, capsaicinoids constitute a particular class of (poly)phenolic because of conflicting reports on their classification as alkaloids or phenolic compounds ("Capsaicin and Capsaicinoids"). These *Capsicum* genus-exclusive compounds containing a sole aromatic ring have been assessed for different metabolic purposes (Tremblay, Arguin, and Panahi 2016), which include the modulation of gut microbiota (Patcharatrakul and Gonlachanvit 2016). Capsaicin, the prototypic member of this class, has been shown to modulate gut microbiota in both rodents (Kang et al. 2017; Shen, Shen, et al. 2017; Wang, Tang, et al. 2020) and humans (Kang et al. 2016). Administration of capsaicin (2 mg/kg/day) for 12 weeks to HFD-fed mice increased the relative abundances of *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* families, both pertaining to Firmicutes phylum, with an important decrease of LPS-producing S24-7 family, which is clustered in the Bacteroidetes phylum (Kang et al. 2017). Using a 5-fold higher dose of capsaicin (10 mg/kg/day, 9 weeks), Shen et al found a general increase in the relative abundances of different phyla in faeces of HFD-fed mice, with the exception of Proteobacteria that was reduced (Shen, Shen, et al. 2017). Of note, capsaicin is a naturally occurring agonist of transient receptor potential vanilloid -1 (TRPV1) receptor (Frias and Merighi 2016), whose deletion has been associated to the onset of local inflammation and systemic progression toward sepsis (Fernandes et al. 2012). Indeed, oral administration of capsaicin (2 mg/kg/day, 12 weeks) to female TRPV1<sup>-/-</sup> mice strongly decreased the relative abundances of diverse genera and families pertaining to the endotoxemia-associated Proteobacteria phylum (Table 1) (Wang, Tang, et al. 2020). Thus,

modulatory effects of capsaicin on gut microbiota of TRPV1<sup>-/-</sup> mice consistently support a TRPV1-independent mechanism of action for this compound.

On the other hand, administration of capsaicin to genetically obese mice showed quite opposite modulatory response (Table 1). Dietary supplementation of *ob/ob* mice with 0.01% or 0.02% capsaicin for 6 weeks consistently increased the Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio in both doses (Song et al. 2017), 0.01% capsaicin supplementation in *db/db* mice for 8 weeks prevented the increase of Firmicutes-pertaining bacterial genera with no change in those from Bacteroidetes phylum (Hui et al. 2019). Indeed, *ob/ob* mice have been shown to present a relative abundance of Firmicutes 35% higher than Bacteroidetes, while *db/db* mice presented proportional abundances between these two phyla (Yang, Liu, et al. 2019). Such differences were attributed to their different genetic backgrounds (Yang, Liu, et al. 2019), which might interfere with microbiota response to capsaicin. Similarly, it is reasonable to suggest that the variable modulatory effects herein described for the same compound on different animal models would be also related to their gender, genetic backgrounds or unknown mechanisms involved in their dysbiosis development.

## **6. Relationship between short-chain fatty acids profile and (poly)phenols metabolic effects**

There is an abundance of evidence supporting the colonic SCFAs as signaling molecules linking microbiota modulation to outcomes influencing host energy metabolism (Kuwahara 2014; Canfora, Jocken, and Blaak 2015; Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, and Backhed 2016; Morrison and Preston 2016). However, few reports on the prebiotic role of (poly)phenols within those mentioned in Table 1 have assessed SCFAs levels as a feasible mechanism of action.

The pioneer study by Unno, Sakuma, and Mitsuhashi (2014) correlated the decrease of acetate and butyrate caecal levels with lower adipose tissue accumulation in EGCG-treated

rats, but did not assess metabolic pathways supporting such assumption. When assessing the effects of the flavonoid hesperetin on chow-fed rats, these authors equally found decreased adipose tissue accumulation, which was instead correlated with increased caecal levels of both acetate and butyrate (Unno, Hisada, and Takahashi 2015). Supplementation of dihydrocapsiate decreased faecal levels of all the assessed SCFAs (Baboota et al. 2018), while administration of honokiol increased caecal levels of the same metabolites (Ding et al. 2019), even though both treatments promoted similar metabolic outcomes in HFD-fed mice. On the other hand, resveratrol supplementation to HFD-fed mice (Sung et al. 2017) or rats (Yang, Deng, et al. 2019) improved glucose metabolism and insulin sensitivity with no impact on faecal SCFAs levels. Capsaicin administration to either HFD-fed mice (Kang et al. 2017) or *ob/ob* mice (Song et al. 2017) equally resulted in increased faecal levels of butyrate but did not change acetate and propionate levels. Diametrically opposed findings were recently described by Wang, Tang, et al. (2020), who found that capsaicin increased acetate and propionate, but did not affect butyrate faecal levels in HFD-fed TRPV1<sup>-/-</sup> mice, suggesting a potential role for TRP channels on gut microbiota response to prebiotic (poly)phenols.

Assessment of SCFAs levels in the abovementioned studies led the authors to speculate a relationship between (poly)phenol supplementation, SCFAs profile and metabolic outcomes. However, very limited molecular mechanistic approaches were demonstrated and the SCFAs caecal/faecal profiles do not offer a clear clue towards such speculation. Indeed, from the studies showed in Table 1, the main mechanistic clue toward SCFAs metabolic effects is the recovering of intestinal barrier integrity and reversal of LPS-induced endotoxemia. Porras et al. (2017) demonstrated that quercetin supplementation to HFD-fed mice increased caecal levels of acetate, propionate and butyrate, resulting in body weight and fat accumulation reductions, as well as attenuated liver steatosis. They suggested that these metabolic effects were a result of the recovery of intestinal barrier integrity and reduced serum LPS levels.

(Porras et al. 2017). Likewise, Wang et al (2020) also ascribed the health metabolic outcomes of capsaicin supplementation to its impact on LPS serum levels, besides higher stimulation of GLP-1 and PYY production by SCFA-responding colonocytes overexpressing *Gpr43* gene (Wang, Tang, et al. 2020). Finally, beneficial modulatory effects of capsaicin on HFD-fed mice microbiota were prevented by HU-210, an agonist of cannabinoid receptor 1 (CB<sub>1</sub>), suggesting that CB<sub>1</sub> inhibition by capsaicin stimulates caecal butyrogenic bacteria to increase butyrate levels (Kang et al. 2017).

The knowledge about the molecular pathways activated by SCFA has consistently evolved since the de-orphanization of their receptors GPR41, GPR43, and GPR109a more than a decade ago (Milligan, Stoddart, and Smith 2009). A considerable number of recent reviews have centered on the function and pharmacology of these receptors and proposed them as potential targets for drug design and cost-effective therapeutic treatments of neuroendocrine disorders (Cani 2019; Bolognini et al. 2016; Hu et al. 2018; Priyadarshini et al. 2016) In spite of recent advances, there is virtually no assessment of the transcriptional and post-translational levels of these receptors or their downstream signaling pathways in response to prebiotic (poly)phenols supplementation. Thus, despite of all the metabolic benefits provided by prebiotic (poly)phenols, the mechanistic implication of SCFAs still cares further supporting data.

## **7. Closing remarks and perspectives**

Phytochemicals are capital to evidence-based pharmacology and modern drug development strategies. As discussed above, prebiotic (poly)phenols play pivotal role in the microbiota metabolism, modulating the production of SCFAs and other byproducts that ultimately improve host neuroendocrine homeostasis. However, despite the increased appreciation of gut microbiota as a pharmacological target, biochemical and molecular signaling pathways underlying metabolic outcomes in the host remain underexplored.

Consequently, microbiota-based phytopharmacological studies have offered more descriptive than mechanistic analyses (Table 1).

Some factors may contribute to the poor assessment of (poly)phenols mechanisms of action. Firstly, bioavailability of parent phytochemicals is much lower in the systemic circulation relative to their microbiota-degraded metabolites or microbiota-derived byproducts, which are likely responsible for the bioactivities of the parent compounds. Secondly, chromatography- and mass spectrometry-based protocols have allowed the assessment of either caecal or fecal SCFAs levels, but accurate measurement of their very lower serum levels is still technically challenging. Finally, several studies have shown conflicting responses for the same (poly)phenol, probably due to the wide inter-individual variability in microbiota, which detains researchers from proposing a standardized SCFAs healthy profile, and consequently a precise mechanism of action, in response to a given compound.

Thus, despite the consistent evidence supporting the prebiotic role of (poly)phenols, there is scarce data corroborating SCFAs as mediators linking microbiota modulation to health neuroendocrine and metabolic outcomes. Indeed, before making claims on a mechanistic role of SCFAs, further information on gut:blood SCFAs ratios, as well as knowledge regarding the individual contributions of each of the major SCFAs to such outcomes is needed. Nevertheless, the increasing interest on microbiota-targeted therapeutic strategies, allied to emerging technologies, will open future lines of investigation to assess the individual profile of SCFAs. This will be of particular importance as a supportive tool for the prescription and follow-up of patients under prebiotic (poly)phenols regimens.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico, Tecnológico e Inovação do Estado do Maranhão – FAPEMA ( PAEDT-03290/ 17,

UNIVERSAL-00523/14, UNIVERSAL-01197/17, fellowship to RBLF), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Finance Code 001) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico – CNPq (Fellowship to MVCB and AMAP (308163/2019-2)). Authors are also thankful to Thaianne Coelho dos Santos and Thamires Coelho dos Santos for drawing Figure 1 and to Dr. Renato Simões Gaspar for the grammatical revision.

**Declaration of interest statement**

The authors declare no conflict of interest.



## References

- Aoki, R., K. Kamikado, W. Suda, H. Takii, Y. Mikami, N. Suganuma, M. Hattori, and Y. Koga. 2017. "A proliferative probiotic Bifidobacterium strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation." *Sci Rep* 7:43522. doi: 10.1038/srep43522.
- Armougom, F., M. Henry, B. Vialettes, D. Raccach, and D. Raoult. 2009. "Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients." *PLoS One* 4 (9):e7125. doi: 10.1371/journal.pone.0007125.
- Baboota, R. K., P. Khare, P. Mangal, D. P. Singh, K. K. Bhutani, K. K. Kondepudi, J. Kaur, and M. Bishnoi. 2018. "Dihydrocapsiate supplementation prevented high-fat diet-induced adiposity, hepatic steatosis, glucose intolerance, and gut morphological alterations in mice." *Nutr Res* 51:40-56. doi: 10.1016/j.nutres.2017.11.006.
- Backhed, F., J. Roswall, Y. Peng, Q. Feng, H. Jia, P. Kovatcheva-Datchary, Y. Li, et al. 2015. "Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life." *Cell Host Microbe* 17 (5):690-703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.
- Baothman, O. A., M. A. Zamzami, I. Taher, J. Abubaker, and M. Abu-Farha. 2016. "The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes." *Lipids Health Dis* 15:108. doi: 10.1186/s12944-016-0278-4.
- Boets, E., S. V. Gomand, L. Deroover, T. Preston, K. Vermeulen, V. De Preter, H. M. Hamer, et al. 2017. "Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study." *J Physiol* 595 (2):541-55. doi: 10.1113/JP272613.
- Bolognini, Daniele, Andrew B. Tobin, Graeme Milligan, and Catherine E. Moss. 2016. "The Pharmacology and Function of Receptors for Short-Chain Fatty Acids." *Molecular Pharmacology* 89 (3):388-98. doi: 10.1124/mol.115.102301.
- Brahe, L. K., A. Astrup, and L. H. Larsen. 2016. "Can We Prevent Obesity-Related Metabolic Diseases by Dietary Modulation of the Gut Microbiota?" *Adv Nutr* 7 (1):90-101. doi: 10.3945/an.115.010587.
- Brandt, N., D. Kotowska, C. M. Kristensen, J. Olesen, D. O. Lutzhoft, J. F. Halling, M. Hansen, et al. 2018. "The impact of exercise training and resveratrol supplementation on gut microbiota composition in high-fat diet fed mice." *Physiol Rep* 6 (20):e13881. doi: 10.14814/phy2.13881.
- Brown, A. J., S. M. Goldsworthy, A. A. Barnes, M. M. Eilert, L. Tcheang, D. Daniels, A. I. Muir, et al. 2003. "The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids." *J Biol Chem* 278 (13):11312-9. doi: 10.1074/jbc.M211609200.
- Brun, P., I. Castagliuolo, V. Di Leo, A. Buda, M. Pinzani, G. Palu, and D. Martines. 2007. "Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292 (2):G518-25. doi: 10.1152/ajpgi.00024.2006.
- Bruun, J. M., J. W. Helge, B. Richelsen, and B. Stallknecht. 2006. "Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 (5):E961-7. doi: 10.1152/ajpendo.00506.2005.

- Canfora, E. E., J. W. Jocken, and E. E. Blaak. 2015. "Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity." *Nat Rev Endocrinol* 11 (10):577-91. doi: 10.1038/nrendo.2015.128.
- Cani, P. D. 2018. "Human gut microbiome: hopes, threats and promises." *Gut* 67 (9):1716-25. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316723.
- . 2019. "Microbiota and metabolites in metabolic diseases." *Nat Rev Endocrinol* 15 (2):69-70. doi: 10.1038/s41574-018-0143-9.
- Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, et al. 2007. "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* 56 (7):1761-72. doi: 10.2337/db06-1491.
- Cani, P. D., E. Lecourt, E. M. Dewulf, F. M. Sohet, B. D. Pachikian, D. Naslain, F. De Backer, A. M. Neyrinck, and N. M. Delzenne. 2009. "Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal." *Am J Clin Nutr* 90 (5):1236-43. doi: 10.3945/ajcn.2009.28095.
- "Capsaicin and Capsaicinoids." In *Modern Alkaloids*, 73-109.
- Cardona, F., C. Andres-Lacueva, S. Tulipani, F. J. Tinahones, and M. I. Queipo-Ortuno. 2013. "Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health." *J Nutr Biochem* 24 (8):1415-22. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.001.
- Chambers, E. S., A. Viardot, A. Psichas, D. J. Morrison, K. G. Murphy, S. E. Zac-Varghese, K. MacDougall, et al. 2015. "Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults." *Gut* 64 (11):1744-54. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307913.
- Chen, T., A. B. Liu, S. Sun, N. J. Ajami, M. C. Ross, H. Wang, L. Zhang, et al. 2019. "Green Tea Polyphenols Modify the Gut Microbiome in db/db Mice as Co-Abundance Groups Correlating with the Blood Glucose Lowering Effect." *Mol Nutr Food Res* 63 (8):e1801064. doi: 10.1002/mnfr.201801064.
- Clifford, M. N. 2004. "Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health." *Planta Med* 70 (12):1103-14. doi: 10.1055/s-2004-835835.
- Dao, T. M., A. Waget, P. Klopp, M. Serino, C. Vachoux, L. Pechere, D. J. Drucker, et al. 2011. "Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control." *PLoS One* 6 (6):e20700. doi: 10.1371/journal.pone.0020700.
- Daud, N. M., N. A. Ismail, E. L. Thomas, J. A. Fitzpatrick, J. D. Bell, J. R. Swann, A. Costabile, et al. 2014. "The impact of oligofructose on stimulation of gut hormones, appetite regulation and adiposity." *Obesity (Silver Spring)* 22 (6):1430-8. doi: 10.1002/oby.20754.
- Davenport, E. R., J. G. Sanders, S. J. Song, K. R. Amato, A. G. Clark, and R. Knight. 2017. "The human microbiome in evolution." *BMC Biol* 15 (1):127. doi: 10.1186/s12915-017-0454-7.
- De Filippo, C., D. Cavalieri, M. Di Paola, M. Ramazzotti, J. B. Poullet, S. Massart, S. Collini, G. Pieraccini, and P. Lionetti. 2010. "Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (33):14691-6. doi: 10.1073/pnas.1005963107.
- De Vadder, F., P. Kovatcheva-Datchary, D. Goncalves, J. Vinera, C. Zitoun, A. Duchamp, F. Backhed, and G. Mithieux. 2014. "Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits." *Cell* 156 (1-2):84-96. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.016.
- den Besten, G., A. Bleeker, A. Gerding, K. van Eunen, R. Havinga, T. H. van Dijk, M. H. Oosterveer, et al. 2015. "Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-

- Induced Obesity via a PPAR $\gamma$ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation." *Diabetes* 64 (7):2398-408. doi: 10.2337/db14-1213.
- den Besten, G., K. van Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D. J. Reijngoud, and B. M. Bakker. 2013. "The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism." *J Lipid Res* 54 (9):2325-40. doi: 10.1194/jlr.R036012.
- Ding, Y., Z. Song, H. Li, L. Chang, T. Pan, X. Gu, X. He, and Z. Fan. 2019. "Honokiol Ameliorates High-Fat-Diet-Induced Obesity of Different Sexes of Mice by Modulating the Composition of the Gut Microbiota." *Front Immunol* 10:2800. doi: 10.3389/fimmu.2019.02800.
- Dominguez-Bello, M. G., E. K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, N. Fierer, and R. Knight. 2010. "Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (26):11971-5. doi: 10.1073/pnas.1002601107.
- Dominguez-Bello, M. G., K. M. De Jesus-Laboy, N. Shen, L. M. Cox, A. Amir, A. Gonzalez, N. A. Bokulich, et al. 2016. "Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer." *Nat Med* 22 (3):250-3. doi: 10.1038/nm.4039.
- Duenas, M., I. Munoz-Gonzalez, C. Cueva, A. Jimenez-Giron, F. Sanchez-Patan, C. Santos-Buelga, M. V. Moreno-Arribas, and B. Bartolome. 2015. "A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols." *Biomed Res Int* 2015:850902. doi: 10.1155/2015/850902.
- Duncan, S. H., A. Barcenilla, C. S. Stewart, S. E. Pryde, and H. J. Flint. 2002. "Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine." *Appl Environ Microbiol* 68 (10):5186-90. doi: 10.1128/aem.68.10.5186-5190.2002.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman. 2005. "Diversity of the human intestinal microbial flora." *Science* 308 (5728):1635-8. doi: 10.1126/science.1110591.
- Etxeberría, U., E. Hijona, L. Aguirre, F. I. Milagro, L. Bujanda, A. M. Rimando, J. A. Martínez, and M. P. Portillo. 2017. "Pterostilbene-induced changes in gut microbiota composition in relation to obesity." *Mol Nutr Food Res* 61 (1). doi: 10.1002/mnfr.201500906.
- Everard, A., C. Belzer, L. Geurts, J. P. Ouwerkerk, C. Druart, L. B. Bindels, Y. Guiot, et al. 2013. "Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (22):9066-71. doi: 10.1073/pnas.1219451110.
- Everard, A., V. Lazarevic, M. Derrien, M. Girard, G. G. Muccioli, A. M. Neyrinck, S. Possemiers, et al. 2011. "Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice." *Diabetes* 60 (11):2775-86. doi: 10.2337/db11-0227.
- Farhat, G., S. Drummond, and E. A. S. Al-Dujaili. 2017. "Polyphenols and Their Role in Obesity Management: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials." *Phytother Res* 31 (7):1005-18. doi: 10.1002/ptr.5830.
- Fernandes, E. S., L. Liang, S. J. Smillie, F. Kaiser, R. Purcell, D. W. Rivett, S. Alam, et al. 2012. "TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome." *J Immunol* 188 (11):5741-51. doi: 10.4049/jimmunol.1102147.
- Fraga, C. G., K. D. Croft, D. O. Kennedy, and F. A. Tomas-Barberan. 2019. "The effects of polyphenols and other bioactives on human health." *Food Funct* 10 (2):514-28. doi: 10.1039/c8fo01997e.

- Freeland, K. R., and T. M. Wolever. 2010. "Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha." *Br J Nutr* 103 (3):460-6. doi: 10.1017/s0007114509991863.
- Frias, B., and A. Merighi. 2016. "Capsaicin, Nociception and Pain." *Molecules* 21 (6). doi: 10.3390/molecules21060797.
- Frost, G., M. L. Sleeth, M. Sahuri-Arisoylu, B. Lizarbe, S. Cerdan, L. Brody, J. Anastasovska, et al. 2014. "The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism." *Nat Commun* 5:3611. doi: 10.1038/ncomms4611.
- Furet, J. P., L. C. Kong, J. Tap, C. Poitou, A. Basdevant, J. L. Bouillot, D. Mariat, et al. 2010. "Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers." *Diabetes* 59 (12):3049-57. doi: 10.2337/db10-0253.
- Gao, Z., J. Yin, J. Zhang, R. E. Ward, R. J. Martin, M. Lefevre, W. T. Cefalu, and J. Ye. 2009. "Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice." *Diabetes* 58 (7):1509-17. doi: 10.2337/db08-1637.
- Gibson, G. R., R. Hutkins, M. E. Sanders, S. L. Prescott, R. A. Reimer, S. J. Salminen, K. Scott, et al. 2017. "Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14 (8):491-502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gill, P. A., M. C. van Zelm, J. G. Muir, and P. R. Gibson. 2018. "Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders." *Aliment Pharmacol Ther* 48 (1):15-34. doi: 10.1111/apt.14689.
- Hawkesworth, S., S. E. Moore, A. J. Fulford, G. R. Barclay, A. A. Darboe, H. Mark, O. A. Nyan, and A. M. Prentice. 2013. "Evidence for metabolic endotoxemia in obese and diabetic Gambian women." *Nutr Diabetes* 3:e83. doi: 10.1038/nutd.2013.24.
- Henning, S. M., J. Yang, M. Hsu, R. P. Lee, E. M. Grojean, A. Ly, C. H. Tseng, D. Heber, and Z. Li. 2018. "Decaffeinated green and black tea polyphenols decrease weight gain and alter microbiome populations and function in diet-induced obese mice." *Eur J Nutr* 57 (8):2759-69. doi: 10.1007/s00394-017-1542-8.
- Hill, C., F. Guarner, G. Reid, G. R. Gibson, D. J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, et al. 2014. "Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11 (8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
- Hu, Jiamiao, Shaoling Lin, Baodong Zheng, and Peter CK Cheung. 2018. "Short-chain fatty acids in control of energy metabolism." *Critical reviews in food science and nutrition* 58 (8):1243-9.
- Hui, S., Y. Liu, M. Chen, X. Wang, H. Lang, M. Zhou, L. Yi, and M. Mi. 2019. "Capsaicin Improves Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity Through Modulation of the Gut Microbiota-Bile Acid-FXR Axis in Type 2 Diabetic db/db Mice." *Mol Nutr Food Res* 63 (23):e1900608. doi: 10.1002/mnfr.201900608.
- Human Microbiome Project, Consortium. 2012. "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." *Nature* 486 (7402):207-14. doi: 10.1038/nature11234.
- Ikarashi, N., S. Ogawa, R. Hirobe, R. Kon, Y. Kusunoki, M. Yamashita, N. Mizukami, et al. 2017. "Epigallocatechin gallate induces a hepatospecific decrease in the CYP3A expression level by altering intestinal flora." *Eur J Pharm Sci* 100:211-8. doi: 10.1016/j.ejps.2017.01.022.

- Jimenez, E., M. L. Marin, R. Martin, J. M. Odriozola, M. Olivares, J. Xaus, L. Fernandez, and J. M. Rodriguez. 2008. "Is meconium from healthy newborns actually sterile?" *Res Microbiol* 159 (3):187-93. doi: 10.1016/j.resmic.2007.12.007.
- Jocken, J. W. E., M. A. Gonzalez Hernandez, N. T. H. Hoebers, C. M. van der Beek, Y. P. G. Essers, E. E. Blaak, and E. E. Canfora. 2017. "Short-Chain Fatty Acids Differentially Affect Intracellular Lipolysis in a Human White Adipocyte Model." *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:372. doi: 10.3389/fendo.2017.00372.
- Jung, M. J., J. Lee, N. R. Shin, M. S. Kim, D. W. Hyun, J. H. Yun, P. S. Kim, T. W. Whon, and J. W. Bae. 2016. "Chronic Repression of mTOR Complex 2 Induces Changes in the Gut Microbiota of Diet-induced Obese Mice." *Sci Rep* 6:30887. doi: 10.1038/srep30887.
- Kang, C., B. Wang, K. Kaliannan, X. Wang, H. Lang, S. Hui, L. Huang, et al. 2017. "Gut Microbiota Mediates the Protective Effects of Dietary Capsaicin against Chronic Low-Grade Inflammation and Associated Obesity Induced by High-Fat Diet." *MBio* 8 (3). doi: 10.1128/mBio.00470-17.
- Kang, C., Y. Zhang, X. Zhu, K. Liu, X. Wang, M. Chen, J. Wang, et al. 2016. "Healthy Subjects Differentially Respond to Dietary Capsaicin Correlating with Specific Gut Enterotypes." *J Clin Endocrinol Metab* 101 (12):4681-9. doi: 10.1210/jc.2016-2786.
- Keylor, M. H., B. S. Matsuura, and C. R. Stephenson. 2015. "Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products." *Chem Rev* 115 (17):8976-9027. doi: 10.1021/cr500689b.
- Koh, A., F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, and F. Backhed. 2016. "From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites." *Cell* 165 (6):1332-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
- Kundu, P., E. Blacher, E. Elinav, and S. Pettersson. 2017. "Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self." *Cell* 171 (7):1481-93. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.024.
- Kuwahara, A. 2014. "Contributions of colonic short-chain Fatty Acid receptors in energy homeostasis." *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:144. doi: 10.3389/fendo.2014.00144.
- Larraufie, P., C. Martin-Gallausiaux, N. Lapaque, J. Dore, F. M. Gribble, F. Reimann, and H. M. Blottiere. 2018. "SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells." *Sci Rep* 8 (1):74. doi: 10.1038/s41598-017-18259-0.
- Larrosa, M., M. J. Yanez-Gascon, M. V. Selma, A. Gonzalez-Sarrias, S. Toti, J. J. Ceron, F. Tomas-Barberan, P. Dolara, and J. C. Espin. 2009. "Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model." *J Agric Food Chem* 57 (6):2211-20. doi: 10.1021/jf803638d.
- Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon. 2005. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.
- Ley, R. E., C. A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight, and J. I. Gordon. 2008. "Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota." *Nat Rev Microbiol* 6 (10):776-88. doi: 10.1038/nrmicro1978.
- Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, S. Klein, and J. I. Gordon. 2006. "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." *Nature* 444 (7122):1022-3. doi: 10.1038/4441022a.
- Li, X., K. Watanabe, and I. Kimura. 2017. "Gut Microbiota Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases." *Front Immunol* 8:1882. doi: 10.3389/fimmu.2017.01882.
- Li, Y., J. Li, Q. Su, and Y. Liu. 2019. "Sinapine reduces non-alcoholic fatty liver disease in mice by modulating the composition of the gut microbiota." *Food Funct* 10 (6):3637-49. doi: 10.1039/c9fo00195f.

- Liao, W., X. Yin, Q. Li, H. Zhang, Z. Liu, X. Zheng, L. Zheng, and X. Feng. 2018. "Resveratrol-Induced White Adipose Tissue Browning in Obese Mice by Remodeling Fecal Microbiota." *Molecules* 23 (12). doi: 10.3390/molecules23123356.
- Lin, H. V., A. Frassetto, E. J. Kowalik, Jr., A. R. Nawrocki, M. M. Lu, J. R. Kosinski, J. A. Hubert, et al. 2012. "Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms." *PLoS One* 7 (4):e35240. doi: 10.1371/journal.pone.0035240.
- Liu, X., S. Cao, and X. Zhang. 2015. "Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet." *J Agric Food Chem* 63 (36):7885-95. doi: 10.1021/acs.jafc.5b02404.
- Liu, Z., N. Wang, Y. Ma, and D. Wen. 2019. "Hydroxytyrosol Improves Obesity and Insulin Resistance by Modulating Gut Microbiota in High-Fat Diet-Induced Obese Mice." *Front Microbiol* 10:390. doi: 10.3389/fmicb.2019.00390.
- Lloyd-Price, J., G. Abu-Ali, and C. Huttenhower. 2016. "The healthy human microbiome." *Genome Med* 8 (1):51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y.
- Louis, P., and H. J. Flint. 2009. "Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine." *FEMS Microbiol Lett* 294 (1):1-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x.
- Lu, Y., C. Fan, P. Li, Y. Lu, X. Chang, and K. Qi. 2016. "Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Protein-coupled Receptors and Gut Microbiota." *Sci Rep* 6:37589. doi: 10.1038/srep37589.
- Mahowald, M. A., F. E. Rey, H. Seedorf, P. J. Turnbaugh, R. S. Fulton, A. Wollam, N. Shah, et al. 2009. "Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (14):5859-64. doi: 10.1073/pnas.0901529106.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Remesy. 2005. "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." *Am J Clin Nutr* 81 (1 Suppl):230S-42S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.230S.
- Martinez, K. B., J. F. Pierre, and E. B. Chang. 2016. "The Gut Microbiota: The Gateway to Improved Metabolism." *Gastroenterol Clin North Am* 45 (4):601-14. doi: 10.1016/j.gtc.2016.07.001.
- Miller, T. L., and M. J. Wolin. 1996. "Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora." *Appl Environ Microbiol* 62 (5):1589-92.
- Milligan, Graeme, Leigh A. Stoddart, and Nicola J. Smith. 2009. "Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3." *British Journal of Pharmacology* 158 (1):146-53. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00421.x.
- Morrison, D. J., and T. Preston. 2016. "Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism." *Gut Microbes* 7 (3):189-200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
- Most, J., J. Penders, M. Lucchesi, G. H. Goossens, and E. E. Blaak. 2017. "Gut microbiota composition in relation to the metabolic response to 12-week combined polyphenol supplementation in overweight men and women." *Eur J Clin Nutr* 71 (9):1040-5. doi: 10.1038/ejcn.2017.89.
- Murota, K., Y. Nakamura, and M. Uehara. 2018. "Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota." *Biosci Biotechnol Biochem* 82 (4):600-10. doi: 10.1080/09168451.2018.1444467.
- Neal, M. D., C. Leaphart, R. Levy, J. Prince, T. R. Billiar, S. Watkins, J. Li, et al. 2006. "Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier." *J Immunol* 176 (5):3070-9. doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3070.

- Oh, K. J., S. E. Lee, H. Jung, G. Kim, R. Romero, and B. H. Yoon. 2010. "Detection of ureaplasmas by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with cervical insufficiency." *J Perinat Med* 38 (3):261-8. doi: 10.1515/jpm.2010.040.
- Ozdal, T., D. A. Sela, J. Xiao, D. Boyacioglu, F. Chen, and E. Capanoglu. 2016. "The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility." *Nutrients* 8 (2):78. doi: 10.3390/nu8020078.
- Patcharatrakul, T., and S. Gonlachanvit. 2016. "Chili Peppers, Curcumins, and Prebiotics in Gastrointestinal Health and Disease." *Curr Gastroenterol Rep* 18 (4):19. doi: 10.1007/s11894-016-0494-0.
- Perry, R. J., L. Peng, N. A. Barry, G. W. Cline, D. Zhang, R. L. Cardone, K. F. Petersen, R. G. Kibbey, A. L. Goodman, and G. I. Shulman. 2016. "Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome." *Nature* 534 (7606):213-7. doi: 10.1038/nature18309.
- Porras, D., E. Nistal, S. Martinez-Florez, S. Pisonero-Vaquero, J. L. Olcoz, R. Jover, J. Gonzalez-Gallego, M. V. Garcia-Mediavilla, and S. Sanchez-Campos. 2017. "Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation." *Free Radic Biol Med* 102:188-202. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.037.
- Priyadarshini, Medha, Barton Wicksteed, Gary E Schiltz, Annette Gilchrist, and Brian T Layden. 2016. "SCFA receptors in pancreatic  $\beta$  cells: novel diabetes targets?" *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27 (9):653-64.
- Psichas, A., M. L. Sleeth, K. G. Murphy, L. Brooks, G. A. Bewick, A. C. Hanyaloglu, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, and G. Frost. 2015. "The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents." *Int J Obes (Lond)* 39 (3):424-9. doi: 10.1038/ijo.2014.153.
- Pussinen, P. J., A. S. Havulinna, M. Lehto, J. Sundvall, and V. Salomaa. 2011. "Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes." *Diabetes Care* 34 (2):392-7. doi: 10.2337/dc10-1676.
- Qiao, Y., J. Sun, S. Xia, X. Tang, Y. Shi, and G. Le. 2014. "Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity." *Food Funct* 5 (6):1241-9. doi: 10.1039/c3fo60630a.
- Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, et al. 2010. "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." *Nature* 464 (7285):59-65. doi: 10.1038/nature08821.
- Ragsdale, S. W., and E. Pierce. 2008. "Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO(2) fixation." *Biochim Biophys Acta* 1784 (12):1873-98. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.08.012.
- Rastelli, M., C. Knauf, and P. D. Cani. 2018. "Gut Microbes and Health: A Focus on the Mechanisms Linking Microbes, Obesity, and Related Disorders." *Obesity (Silver Spring)* 26 (5):792-800. doi: 10.1002/oby.22175.
- Rauf, A., M. Imran, H. A. R. Suleria, B. Ahmad, D. G. Peters, and M. S. Mubarak. 2017. "A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol." *Food Funct* 8 (12):4284-305. doi: 10.1039/c7fo01300k.
- Rook, G., F. Backhed, B. R. Levin, M. J. McFall-Ngai, and A. R. McLean. 2017. "Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity." *Lancet* 390 (10093):521-30. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30566-4.
- Rumberger, J. M., J. R. Arch, and A. Green. 2014. "Butyrate and other short-chain fatty acids increase the rate of lipolysis in 3T3-L1 adipocytes." *PeerJ* 2:e611. doi: 10.7717/peerj.611.

- Sanders, M. E., D. J. Merenstein, G. Reid, G. R. Gibson, and R. A. Rastall. 2019. "Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3.
- Schwartz, A., D. Taras, K. Schafer, S. Beijer, N. A. Bos, C. Donus, and P. D. Hardt. 2010. "Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects." *Obesity (Silver Spring)* 18 (1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167.
- Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo. 2016. "Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body." *PLoS Biol* 14 (8):e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- Shabana, S. U. Shahid, and U. Irfan. 2018. "The gut microbiota and its potential role in obesity." *Future Microbiol* 13:589-603. doi: 10.2217/fmb-2017-0179.
- Shen, W., M. Shen, X. Zhao, H. Zhu, Y. Yang, S. Lu, Y. Tan, et al. 2017. "Anti-obesity Effect of Capsaicin in Mice Fed with High-Fat Diet Is Associated with an Increase in Population of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila*." *Front Microbiol* 8:272. doi: 10.3389/fmicb.2017.00272.
- Shoelson, S. E., J. Lee, and A. B. Goldfine. 2006. "Inflammation and insulin resistance." *J Clin Invest* 116 (7):1793-801. doi: 10.1172/JCI29069.
- Song, J. X., H. Ren, Y. F. Gao, C. Y. Lee, S. F. Li, F. Zhang, L. Li, and H. Chen. 2017. "Dietary Capsaicin Improves Glucose Homeostasis and Alters the Gut Microbiota in Obese Diabetic ob/ob Mice." *Front Physiol* 8:602. doi: 10.3389/fphys.2017.00602.
- Sreng, N., S. Champion, J. C. Martin, S. Khelaifia, J. E. Christensen, R. Padmanabhan, V. Azalbert, et al. 2019. "Resveratrol-mediated glycemic regulation is blunted by curcumin and is associated to modulation of gut microbiota." *J Nutr Biochem* 72:108218. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108218.
- Stinson, L. F., M. S. Payne, and J. A. Keelan. 2017. "Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota." *Crit Rev Microbiol* 43 (3):352-69. doi: 10.1080/1040841X.2016.1211088.
- Stumpff, F. 2018. "A look at the smelly side of physiology: transport of short chain fatty acids." *Pflugers Arch* 470 (4):571-98. doi: 10.1007/s00424-017-2105-9.
- Sung, M. M., T. T. Kim, E. Denou, C. M. Soltys, S. M. Hamza, N. J. Byrne, G. Masson, et al. 2017. "Improved Glucose Homeostasis in Obese Mice Treated With Resveratrol Is Associated With Alterations in the Gut Microbiome." *Diabetes* 66 (2):418-25. doi: 10.2337/db16-0680.
- Tain, Y. L., W. C. Lee, K. L. H. Wu, S. Leu, and J. Y. H. Chan. 2018. "Resveratrol Prevents the Development of Hypertension Programmed by Maternal Plus Post-Weaning High-Fructose Consumption through Modulation of Oxidative Stress, Nutrient-Sensing Signals, and Gut Microbiota." *Mol Nutr Food Res*:e1800066. doi: 10.1002/mnfr.201800066.
- Tamburini, S., N. Shen, H. C. Wu, and J. C. Clemente. 2016. "The microbiome in early life: implications for health outcomes." *Nat Med* 22 (7):713-22. doi: 10.1038/nm.4142.
- Tan, J., C. McKenzie, M. Potamitis, A. N. Thorburn, C. R. Mackay, and L. Macia. 2014. "The role of short-chain fatty acids in health and disease." *Adv Immunol* 121:91-119. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9.
- Thangaraju, M., G. A. Cresci, K. Liu, S. Ananth, J. P. Gnanaprakasam, D. D. Browning, J. D. Mellinger, et al. 2009. "GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon." *Cancer Res* 69 (7):2826-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4466.
- Tolhurst, G., H. Heffron, Y. S. Lam, H. E. Parker, A. M. Habib, E. Diakogiannaki, J. Cameron, J. Grosse, F. Reimann, and F. M. Gribble. 2012. "Short-chain fatty acids



- stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2." *Diabetes* 61 (2):364-71. doi: 10.2337/db11-1019.
- Tremblay, A., H. Arguin, and S. Panahi. 2016. "Capsaicinoids: a spicy solution to the management of obesity?" *Int J Obes (Lond)* 40 (8):1198-204. doi: 10.1038/ijo.2015.253.
- Tsao, R. 2010. "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols." *Nutrients* 2 (12):1231-46. doi: 10.3390/nu2121231.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. Hamady, C. M. Fraser-Liggett, R. Knight, and J. I. Gordon. 2007. "The human microbiome project." *Nature* 449 (7164):804-10. doi: 10.1038/nature06244.
- Unno, T., T. Hisada, and S. Takahashi. 2015. "Hesperetin Modifies the Composition of Fecal Microbiota and Increases Cecal Levels of Short-Chain Fatty Acids in Rats." *J Agric Food Chem* 63 (36):7952-7. doi: 10.1021/acs.jafc.5b02649.
- Unno, T., M. Sakuma, and S. Mitsuhashi. 2014. "Effect of dietary supplementation of (-)-epigallocatechin gallate on gut microbiota and biomarkers of colonic fermentation in rats." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 60 (3):213-9. doi: 10.3177/jnsv.60.213.
- Ushiroda, C., Y. Naito, T. Takagi, K. Uchiyama, K. Mizushima, Y. Higashimura, Z. Yasukawa, et al. 2019. "Green tea polyphenol (epigallocatechin-3-gallate) improves gut dysbiosis and serum bile acids dysregulation in high-fat diet-fed mice." *J Clin Biochem Nutr* 65 (1):34-46. doi: 10.3164/jcfn.18-116.
- van der Beek, C. M., E. E. Canfora, K. Lenaerts, F. J. Troost, Swmo Damink, J. J. Holst, A. A. M. Masclee, C. H. C. Dejong, and E. E. Blaak. 2016. "Distal, not proximal, colonic acetate infusions promote fat oxidation and improve metabolic markers in overweight/obese men." *Clin Sci (Lond)* 130 (22):2073-82. doi: 10.1042/cs20160263.
- Vulevic, J., A. Juric, G. Tzortzis, and G. R. Gibson. 2013. "A mixture of trans-galactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults." *J Nutr* 143 (3):324-31. doi: 10.3945/jn.112.166132.
- Walker, J. M., P. Eckardt, J. O. Aleman, J. C. da Rosa, Y. Liang, T. Iizumi, S. Etheve, M. J. Blaser, L. Breslow J, and P. R. Holt. 2019. "The effects of trans-resveratrol on insulin resistance, inflammation, and microbiota in men with the metabolic syndrome: A pilot randomized, placebo-controlled clinical trial." *J Clin Transl Res* 4 (2):122-35.
- Wang, H. X., and Y. P. Wang. 2016. "Gut Microbiota-brain Axis." *Chin Med J (Engl)* 129 (19):2373-80. doi: 10.4103/0366-6999.190667.
- Wang, N., Y. Ma, Z. Liu, L. Liu, K. Yang, Y. Wei, Y. Liu, X. Chen, X. Sun, and D. Wen. 2019. "Hydroxytyrosol prevents PM2.5-induced adiposity and insulin resistance by restraining oxidative stress related NF-kappaB pathway and modulation of gut microbiota in a murine model." *Free Radic Biol Med* 141:393-407. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.002.
- Wang, P., D. Li, W. Ke, D. Liang, X. Hu, and F. Chen. 2020. "Resveratrol-induced gut microbiota reduces obesity in high-fat diet-fed mice." *Int J Obes (Lond)* 44 (1):213-25. doi: 10.1038/s41366-019-0332-1.
- Wang, Y., C. Tang, Y. Tang, H. Yin, and X. Liu. 2020. "Capsaicin has an anti-obesity effect through alterations in gut microbiota populations and short-chain fatty acid concentrations." *Food Nutr Res* 64. doi: 10.29219/fnr.v64.3525.
- Wellen, K. E., and G. S. Hotamisligil. 2005. "Inflammation, stress, and diabetes." *J Clin Invest* 115 (5):1111-9. doi: 10.1172/JCI25102.
- Williamson, G., and M. N. Clifford. 2017. "Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols." *Biochem Pharmacol* 139:24-39. doi: 10.1016/j.bcp.2017.03.012.

- Wong, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam, and D. J. Jenkins. 2006. "Colonic health: fermentation and short chain fatty acids." *J Clin Gastroenterol* 40 (3):235-43.
- Yamashita, H., K. Fujisawa, E. Ito, S. Idei, N. Kawaguchi, M. Kimoto, M. Hiemori, and H. Tsuji. 2007. "Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats." *Biosci Biotechnol Biochem* 71 (5):1236-43.
- Yang, C., Q. Deng, J. Xu, X. Wang, C. Hu, H. Tang, and F. Huang. 2019. "Sinapic acid and resveratrol alleviate oxidative stress with modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed rats." *Food Res Int* 116:1202-11. doi: 10.1016/j.foodres.2018.10.003.
- Yang, M., Y. Liu, H. Xie, Z. Wen, Y. Zhang, C. Wu, L. Huang, et al. 2019. "Gut Microbiota Composition and Structure of the Ob/Ob and Db/Db Mice." *Int J Endocrinol* 2019:1394097. doi: 10.1155/2019/1394097.
- Yatsunencko, T., F. E. Rey, M. J. Manary, I. Trehan, M. G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, et al. 2012. "Human gut microbiome viewed across age and geography." *Nature* 486 (7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053.
- Zhao, Y., P. Dua, and W. J. Lukiw. 2015. "Microbial Sources of Amyloid and Relevance to Amyloidogenesis and Alzheimer's Disease (AD)." *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 5 (1):177. doi: 10.4172/2161-0460.1000177.

## CAPÍTULO II

### Artigo de pesquisa original

**Título: Exposição precoce a dieta rica em sacarose induz desordens metabólicas associadas com alterações na microbiota intestinal de ratos *Wistar***

#### **Autores e filiações:**

Perla Lopes de Freitas<sup>1</sup>, Marcus Vinicius Câmara Barros<sup>1</sup>, João Paulo Nascimento Miranda<sup>1</sup>, Rômulo Brênno Lopes Fróes<sup>1</sup>, Caio Fernando Ferreira Coêlho<sup>1</sup>, Katherine M. Kennedy<sup>2,3</sup>, Lucas Martins França<sup>1</sup>, Deborah M. Sloboda<sup>2</sup> e Antonio Marcus de Andrade Paes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio), Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, McMaster University, Hamilton, Canada.

<sup>3</sup>Farncombe Family Digestive Health Research Institute, McMaster University, Hamilton, Canada.

#### **\*Autor correspondente:**

Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio), Avenida dos Portugueses, 1966. Campus Dom Delgado, CEP: 65.080-805. São Luís (MA), Brasil.

E-mail: marcuspaes@ufma.br

## Resumo

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada pela coexistência de pelo menos três desses distúrbios: glicemia de jejum elevada, dislipidemia, pressão arterial elevada e obesidade. Além da resistência à insulina (RI), as alterações na microbiota intestinal têm surgido como um dos principais mecanismos responsáveis por essas alterações cardiometabólicas. A dieta é um dos principais fatores capazes de modular a composição da microbiota intestinal influenciando diretamente na homeostase do hospedeiro. O papel dos açúcares no desenvolvimento da MS vem sendo investigado. No entanto, existem poucos estudos avaliando o efeito da sacarose na microbiota intestinal, principalmente, nos primeiros estágios da vida. Assim, este estudo teve como objetivo investigar o efeito da sacarose no metabolismo glico-lipídico e na microbiota intestinal de ratos alimentados com dieta rica em sacarose após o desmame. Ratos *Wistar* foram alimentados com dieta padrão (CTR; n = 6) ou rica em sacarose (HSD; n = 8) por 22 semanas. O peso corporal, o consumo de ração e o índice de Lee (IL) foram medidos durante todo o período de intervenção com a dieta. O sangue foi coletado durante a eutanásia para determinar os níveis séricos de glicose (GL), triglicérides (TG), colesterol total (CT), ácidos graxos livres (AGL) e insulina. A RI foi avaliada pelo cálculo do HOMA-IR e do índice TyG. Amostras de fígado foram coletadas para análise histológica utilizando a coloração Oil Red, para análise do teor de glicogênio e avaliação da acetilação total de proteínas e expressão da Acot9 por Western blotting. As amostras de fezes coletadas foram imediatamente armazenadas a -80 °C e, posteriormente, utilizadas para extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA e dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto ao peso corporal, IL e consumo energético. No entanto, os animais HSD apresentaram um aumento de 24,5% e 20,3% para a glicose em jejum e pós-prandial, respectivamente. Esse dado foi corroborado pelo aumento de TyG (13,2%), HOMA-IR (180%) e insulina sérica (180%) nos animais HSD. Além disso, eles também apresentaram intolerância à glicose e à insulina. Em relação aos lipídios séricos, o grupo HSD apresentou aumento dos níveis séricos de TG (134,9%) e AGL (42%) quando comparados aos animais CTR. Esse dado é corroborado pela presença de esteatose no fígado desses animais. Além disso, foi observada redução de 47% do glicogênio hepático dos animais HSD em relação ao grupo CTR, como também aumento do TG hepático (9%) nesses animais. De acordo com os dados de sequenciamento, a dieta rica em sacarose modificou a composição da microbiota intestinal de animais HSD, particularmente associada a espécies do filo Firmicutes, cuja alteração foi caracterizada pelo aumento de espécies da família *Lachnospiraceae*, principalmente espécies do gênero *Blautia*. No entanto, houve uma diminuição nas espécies do gênero *Lactobacillus*. O aumento de espécies do filo Firmicutes foi associado a um aumento de AGCC, principalmente o acetato. Nos animais HSD a produção de acetato e propionato foi maior (150% e 62%, respectivamente) em comparação com os animais do grupo CTR. Não houve aumento significativo na acetilação de proteínas totais no fígado. Este resultado foi associado ao aumento da expressão de Acot9 (140%) em animais HSD. Essa proteína está envolvida no tráfico de substratos para a lipogênese *de novo*, contribuindo para a ocorrência de esteatose hepática e para a inibição de processos de acetilação de proteínas. Nossos dados mostram que a dieta HSD foi capaz de modificar a composição da microbiota intestinal, reduzindo a diversidade bacteriana e favorecendo o crescimento de espécies produtoras de AGCC, promovendo alterações metabólicas significativas no eixo intestino-fígado dos animais.

**Palavras-chave:** síndrome metabólica, dieta rica em sacarose, microbiota intestinal, esteatose hepática.

## INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é definida clinicamente por um conjunto de fatores de riscos que promovem o desenvolvimento de doenças metabólicas como a obesidade, a resistência insulínica, o diabetes e doenças cardiovasculares, sendo atualmente um dos maiores desafios para a saúde do mundo moderno (Saklayen 2018). A obesidade abdominal, disglícemia, hipertensão, resistência à insulina e dislipidemia são fatores de risco associados à essa condição e a coexistência de pelo menos três desses fatores de risco caracteriza a SM (Alberti et al. 2009). Não existem dados exatos sobre a prevalência da SM, condição difícil de mensurar, mas acredita-se que seja três vezes mais comum do que o diabetes, cuja prevalência é estimada em cerca de 25% da população mundial. Dessa forma, estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo sejam afetadas pela SM (Nolan et al. 2017; Saklayen 2018). A prevalência da SM é maior em populações urbanas, principalmente de países ocidentais. Porém com a disseminação do estilo de vida ocidental, essa prevalência também vem aumentando em outras regiões, por exemplo, no sudeste asiático (Rochlani et al. 2017).

Além de mudanças no estilo de vida, mudanças na dieta tem provocado um aumento dos fatores de risco associados à síndrome metabólica e suas comorbidades (Schiano et al. 2021). Nesse contexto, pesquisas recentes têm investigado o potencial efeito nocivo à saúde humana do consumo elevado de açúcares refinados ou açúcares de adição, na promoção do aumento dos casos de obesidade, diabetes e síndrome metabólica, principalmente entre crianças e adolescentes (Faruque et al. 2019; Deal et al. 2020; Heras-Gonzalez et al. 2020; Arenaza et al. 2019; Bray and Popkin 2014). Açúcares de adição são monossacarídeos (glicose, frutose) e dissacarídeos (sacarose) adicionados ao alimento durante o processo de preparação/produção ou adicionados no momento do consumo (Fidler Mis et al. 2017). Nas últimas décadas o consumo de alimentos ricos em açúcares de adição aumentou não somente em países ricos, como também em países pobres ou em desenvolvimento (Razzaque 2020). A Organização

Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a ingestão de açúcares de adição não deve ultrapassar 10% do valor energético total da dieta (Organization 2015), porém o consumo desses açúcares, frequentemente, excede o recomendado pela OMS ficando em torno de 25% da energia total ingerida diariamente (Newens and Walton 2016; Fisberg et al. 2018). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, mais de 60% da população relatou consumir quantidades elevadas de açúcares de adição (Fisberg et al. 2018).

A dieta é um dos principais fatores chave capaz de modular a composição da microbiota intestinal, influenciando diretamente a homeostase do hospedeiro (Rinninella et al. 2019). Nos últimos anos, muitos estudos têm evidenciado a relação entre a disbiose da microbiota intestinal e desordens metabólicas, como doenças cardiovasculares (Tang et al. 2019), a obesidade (Ley, Backhed, et al. 2005), o diabetes (Pascale et al. 2019) e doenças associadas a processos inflamatórios como a síndrome do intestino irritável (Bhattarai, Muniz Pedrogo, and Kashyap 2017). Como mostrado por Cani et al. (2012), a interação entre a dieta do indivíduo e a sua microbiota intestinal contribui para o desenvolvimento da inflamação crônica sub-clínica, importante fator associado à ocorrência de condições metabólicas como a SM (Cani et al. 2012).

A patogênese de diferentes doenças do fígado tem sido associadas a composição da microbiota. O fígado está diretamente conectado ao trato gastrointestinal através do eixo intestino-fígado. Nutrientes e metabólitos bacterianos atravessam o epitélio intestinal e são transportados até o fígado pela veia porta contribuindo, assim, para a homeostase do hospedeiro. Sob a condição de disbiose da microbiota intestinal, vários mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). Alterações na barreira intestinal podem promover o aumento da permeabilidade desse epitélio que associado a translocação de metabólitos bacterianos e a endotoxemia comprometem o metabolismo hepático de lipídios (Tilg, Cani, and Mayer 2016; Marra and Svegliati-Baroni 2018; Delzenne et al. 2019).

Entre os metabólitos derivados da atividade microbiana, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são resultantes da fermentação de carboidratos pela microbiota e são utilizados como uma fonte extra de energia por diferentes células do hospedeiro. O butirato é preferencialmente utilizado como substrato energético pelos colonócitos, enquanto o acetato e o propionato podem ser usados como substrato para a síntese de ácidos graxos e gliconeogênese, respectivamente (den Besten, Lange, et al. 2013; Aron-Wisnewsky et al. 2020). O acetato também pode atuar em processos metabólicos importantes associados a acetilação de proteínas não-histônicas, por contribuir com a biossíntese de acetil-CoA, principal substrato para as reações de acetilação (Menzies et al. 2016).

O impacto de dietas ricas em açúcar sobre a microbiota intestinal vem sendo investigado recentemente. Camundongos alimentados com dietas ricas em glicose ou frutose, apresentaram redução da diversidade bacteriana, com aumento da abundância de táxons microbianos específicos que foram associados a endotoxemia metabólica e aumento da permeabilidade intestinal (Do et al. 2018). Em outro estudo com ratos alimentados com 10% de sacarose adicionada a água de beber, foram observadas modificações na composição da microbiota intestinal, endotoxemia metabólica, alterações no metabolismo de lipídios e carboidratos, como também aumento na concentração de acetato nas fezes que foi relacionado ao desenvolvimento de esteatose hepática (Sánchez-Tapia et al. 2020). de Oliveira Neves et al. (2020) também demonstraram que ratos alimentados com uma dieta rica em açúcar (sendo 36% do total de carboidratos referentes a açúcares de adição) apresentaram modificações na composição da microbiota intestinal com aumento da abundância de grupos bacterianos associados com desordens metabólicas (de Oliveira Neves et al. 2020).

No contexto do que foi citado acima, em relação ao consumo de açúcares de adição e a modificação da microbiota intestinal, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito de uma dieta rica em sacarose (HSD) sobre a composição da microbiota intestinal de ratos, logo após

ao desmame, a produção de ácidos graxos de cadeia curta e o potencial efeito desses metabólitos bacterianos sobre o eixo intestino-fígado. Para tal investigação, usamos uma dieta cuja composição referente a concentração de sacarose (em torno de 25% do total de carboidratos) é semelhante ao consumo de sacarose encontrado em países da América Latina (Fisberg et al. 2018). Nossos dados mostram que a dieta HSD foi capaz de modificar a composição da microbiota intestinal dos animais, reduzindo a diversidade bacteriana, favorecendo o crescimento de espécies produtoras de AGCC, promovendo, dessa forma, alterações metabólicas significativas no eixo intestino-fígado dos animais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Desenho experimental**

Ratos machos da espécie *Rattus norvegicus var. Wistar*, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão, logo após o desmame (21 dias de vida), foram randomizados em 2 grupos: grupo controle (CTR; n=6), alimentados com a ração padrão (Nuvital®, Nuvilab, Brazil), sendo 55,4% do total de calorias referente a carboidratos (10% de sacarose), 21% de proteínas, 5,2% de lipídios, totalizando 3,52 Kcal/g; ou alimentados com dieta rica em sacarose (HSD; n = 8) sendo 65% do total de calorias referente a carboidratos (25% de sacarose), 12,3 % de proteínas, 4,3% de lipídios, totalizando 3,48 Kcal/g como previamente descrito por Pinto et al. (2016) e Sousa et al. (2018) (Pinto, Melo, Flister, França, et al. 2016; Sousa et al. 2018) por um período de 22 semanas. Os animais foram mantidos em local com temperatura controlada ( $21^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; 60% de umidade e 12-h de ciclo luz/escuro) com água e ração *ad libitum*. Durante todo o período de intervenção com a dieta, o desenvolvimento da obesidade foi avaliado pelo cálculo do Índice de Lee [(peso corporal (g))<sup>1/3</sup>/comprimento



naso-anal (cm) x 1000] (Bernardis and Patterson 1968). O consumo de ração e a avaliação do desenvolvimento ponderal foram realizados três vezes por semana.

Durante a última semana de intervenção com a dieta, amostras de fezes foram coletadas e imediatamente estocadas em freezer a -80 °C e, subsequentemente, usadas para a extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento do gene bacteriano 16S rRNA. Durante a 22ª semana, os animais foram colocados em jejum de 8 horas, para a mensuração da glicemia pela cauda (glicosímetro Accucheck Active®) com subsequente realização do teste oral de tolerância a glicose (OGTT) e teste intraperitoneal de tolerância a insulina (*ipITT*). No período determinado (22 semanas), os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (10 mg/kg xilazina+40 mg/kg cetamine via intraperitoneal) e foram realizadas coletas de sangue para as dosagens bioquímicas via artéria mesentérica. Por fim, foram laparotomizados para a retirada dos coxins adiposos (gordura periepídidimal, retroperitoneal, mesentérico e marrom), fígado, intestino e músculos sóleo e gastrocnêmio que foram lavados com solução salina, dessecados e pesados (Moon et al. 2013). Todas as amostras foram conservadas e armazenadas (-80 C) para futuras análises de expressão gênica e proteica. As carcaças dos animais sacrificados foram prontamente identificadas e refrigeradas (-20°C) sendo encaminhadas, no dia seguinte, ao Biotério Central da UFMA para o correto descarte.

Todos os procedimentos realizados com animais estavam de acordo com o Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-UFMA), os quais foram submetidos para análise e aprovados pelo CEUA-UFMA sob o número de processo 23115.016318/2016-96.

### **Avaliação do perfil bioquímico sérico**

Os níveis de glicose (GL), colesterol total, triglicerídeos (TG) e ácidos graxos livres foram avaliadas em amostras de soro por métodos espectrofotométricos utilizando *kits* laboratoriais de acordo com as instruções do fabricante ((Labtest, MG, Brazil, and Wako, VA,

USA; Sigma-Aldrich, USA). O nível sérico de insulina foi avaliado por imunoenensaio (Sigma-Aldrich, USA) seguindo as instruções do fabricante. A resistência insulínica foi inferida pelo cálculo dos índices TyG ( $TyG = \text{natural logarithm fasting TG mg/dL} \times \text{fasting GL mg/dL} / 2$ ) (Guerrero-Romero et al. 2010) e HOMA-IR (homeostasis model assessment index [ $HOMA-IR = \text{fasting glucose (mM)} \cdot \text{fasting insulinemia } (\mu\text{U/ml}) \cdot 22.5^{-1}$ ])) (Matthews et al. 1985).

A concentração sérica de LPS foi determinada pelo ensaio do lisado de amebócito através de kit comercial ((Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit; Thermo Scientific #A39552). Neste ensaio, as amostras são primeiramente diluídas de 1/50 até 1/100 e aquecidas por 15 min a 70 °C. Após este primeiro passo, as amostras foram estocadas a 2-8 °C por menos de 24h para parar toda a atividade bacteriana. Depois as amostras e o padrão foram incubados com o lisado de amebócito por 14min e, em seguida, com o substrato cromogênico por 6min. Após a solução de parada, a leitura foi realizada em comprimento de onda de 405nm.

### **Histologia e glicogênio hepático**

As amostras de fígado foram incluídas no composto Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, EUA) e congeladas rapidamente em uma mistura de gelo seco e 2-metilpentano (Fisher Scientific, EUA). Cortes de fígado com 10 μm de espessura foram fixados em formol a 10% e corados com Oil Red O (Sigma-Aldrich, EUA). Essas seções foram analisadas por dois pesquisadores de uma maneira cega independente para determinar o escore NAFLD / NASH para o grau de esteato-hepatite, de acordo com os critérios definidos previamente (Kleiner et al. 2005). As lâminas foram digitalizadas usando um microscópio Olympus BX53 (Olympus America, EUA), e as imagens digitais de alta resolução foram capturadas em um computador com ampliações de alta potência (X4 ou X20).

Para determinação do glicogênio hepático foi realizado o protocolo Hassid and Abraham (1957) com algumas modificações. Amostras (250 mg) de fígado foram colocadas em tubos contendo 1 ml de KOH 30% e fervidas (100 °C) por 1 h para completa homogeneização. Em

seguida, em cada tubo foi adicionado 100 µl de NaSO<sub>4</sub> 50% e 3,5 ml de etanol (70%) e, então, fervido (100 °C, 15 min) para precipitação do glicogênio. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm (20 min) e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em água quente. Em 5 µl dessa ressuspensão foi adicionado 445 µl de H<sub>2</sub>O e 1 ml da antrona 0,2% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Essa mistura foi aquecida (100 °C, 15 min) e o conteúdo de glicogênio mensurado por espectrofotometria (650 nm).

### **Avaliação da acetilação proteica por Western Blotting**

Amostras de fígado (n=14) foram homogeneizadas por sonicação com o tampão de lise contendo inibidores de proteases (1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina e 10 mM PMSF) e fosfatases (2 mM ortovanato de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio e 10 mM β-glicerolfosfato). 30 µg de proteína de cada amostra foi diluída com tampão de amostra Laemmli e carregado em gel SDS-PAGE para separação proteica. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Para detecção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos primários: [anti-Acetylated-Lysine (1:1000; Cell Signaling, USA, Cat# 9441), anti-Acot9 (1:1000; Invitrogen, USA, Cat# PA5-109356), anti-β-Actin (1:1000; Sigma-Aldrich, USA, Cat# A5441)]. Em seguida, foi realizado a incubação por 1 h (temperatura ambiente) com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase. A revelação das proteínas foi feita por quimioluminescência utilizando kit SuperSignal™ (Thermo Scientific, USA, Cat. #34577). Os resultados foram expressos baseados na densidade relativa da β-actina (1:10.000; Sigma Aldrich, USA).

### **Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA**

O DNA genômico foi extraído e a amplificação da região V3V4 do gene 16S rRNA foi realizada conforme descrito anteriormente (Bartram et al. 2011; Whelan et al. 2014). Resumidamente, cada *pellet* fecal foi homogeneizado mecanicamente e lisado enzimaticamente

antes da extração de DNA com fenol-clorofórmio-isoamil. A amplificação da região V3V4 foi realizada usando primers reversos adaptados a um barcode. Cada reação continha 5 pmol de primer, 200 mM de dNTPs, 1,5ul 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de 10 mg / ml de soro albumina bovina (irradiado com um transiluminador para eliminar DNA contaminante) e 0,25ul de Taq polimerase (Life Technologies, Canadá) para um volume total de reação de 50 µl. Os produtos de PCR foram purificados por eletroforese em gel e subsequentemente sequenciados usando a plataforma Illumina MiSeq (2x150bp) no Farncombe Genomics Facility (McMaster University, Hamilton ON, Canadá).

### **Análise do sequenciamento do gene 16S rRNA**

Os arquivos FASTQ resultantes foram processados usando um pipeline interno personalizado (Whelan et al. 2014). Os *reads* que excederam o comprimento da região 16S rRNA V3 foram cortadas usando Cutadapt (Martin 2011), e os *reads* emparelhados foram alinhadas usando PANDASeq (Masella et al. 2012). *Amplicons* de sequências variantes (ASVs) foram geradas usando DADA2 (Callahan et al. 2016b) e taxonomia foi atribuída usando o RDP Classifier (Ribosomal Database Project, RRID: SCR\_006633) contra o banco de dados de referência Silva 132. ASVs não bacterianos foram removidos por taxa de exclusão pertencentes ao reino Eukaryota, um filo desconhecido, ou a família Mitocôndria.

A análise dos dados de sequenciamento foi realizada em R (Projeto R para Computação Estatística, RRID: SCR\_001905). Medidas de alfa diversidade dos dados ASV rarefeitos foram calculadas usando o índice de diversidade de Shannon (phyloseq, RRID: SCR\_013080) e analisadas por modelo linear misto com tratamento (HFCS vs controle) e dia (3 semanas vs 6 semanas) como efeitos fixos e ID de camundongo como um efeito aleatório. A beta diversidade de contagens de ASV normalizadas (soma total escalonada) foi calculada usando a métrica de dissimilaridade de Bray Curtis e visualizada através da ordenação da Análise das Principais Coordenadas (PCoA) (ggplot2, RRID: SCR\_014601). As diferenças de toda a comunidade

entre os grupos foram analisadas usando análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) e o comando adonis (vegan; RRID: SCR\_011950). DESeq2 (RRID: SCR\_015687) foi usado para identificar gêneros que diferiam significativamente entre os grupos (limite de significância definido como um valor  $p < 0,01$  após o ajuste para testes múltiplos via implementação DESeq2 do procedimento de ajuste de testes múltiplos de Benjamini-Hochberg) e visualizado usando ggplot2.

### **Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)**

Os níveis de AGCC foram medidos em amostras fecais por Cromatografia Gasosa e Detecção de Ionização de Chama (CG-FID). Quantidade equivalente em peso de 100 mg de amostras fecais foi suspensa em 1 mL de ácido fosfórico a 5%, homogeneizada por 1 minuto em um vórtice e, em seguida, centrifugada para remover o sobrenadante. 1,9 mL de acetato de etila P.A. foi adicionado ao conteúdo, homogeneizado por 1 minuto em vórtice e depois centrifugado a 2000G por 2 minutos a 4 ° C. A fase orgânica foi removida e armazenada em frasco. Para as amostras padrão, o mesmo processo foi realizado em solução de 1 mL, com 4 µL dos padrões para cada AGCC em acetato de etila.

A análise dos AGCC foi realizada segundo Masood et al, 2005, com adaptações. A leitura foi realizada em um cromatógrafo gasoso Trace 1310 (Thermo Scientific), utilizando uma coluna DB-FFAP de 15 m x 0,1 mm DI x 0,1 µm de espessura (J&W Scientific da Agilent Technologies). A configuração da temperatura começa em 90 ° C, que é então aumentada em 40 ° C / min até 150 ° C, 12,5 ° C / min até 170 ° C, 58,5 ° C / min até 240 ° C e mantida por 1 minuto. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio / nitrogênio com pressão constante de 345 kPa. O Detector de Ionização por Chama foi programado para 250 ° C, ar sintético e nitrogênio em vazão de 350mL / min e 40mL / min, respectivamente, na proporção de 30: 1, e volume de injeção de 1 µL.

## Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias. A análise dos dados dos experimentos foi realizada por meio dos testes estatísticos paramétricos (teste t de Student não pareado e unicaudal). As diferenças foram significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Os animais HSD não apresentaram alterações quanto ao ganho de peso corporal ou ao índice de Lee em relação ao grupo controle no período de 150 dias. O consumo de ração dos animais diminuiu após a 5ª semana de avaliação, sendo mantido até o final do período de intervenção com a dieta, mas sem diferenças significativas entre os grupos CTR e HSD (Fig. 1).

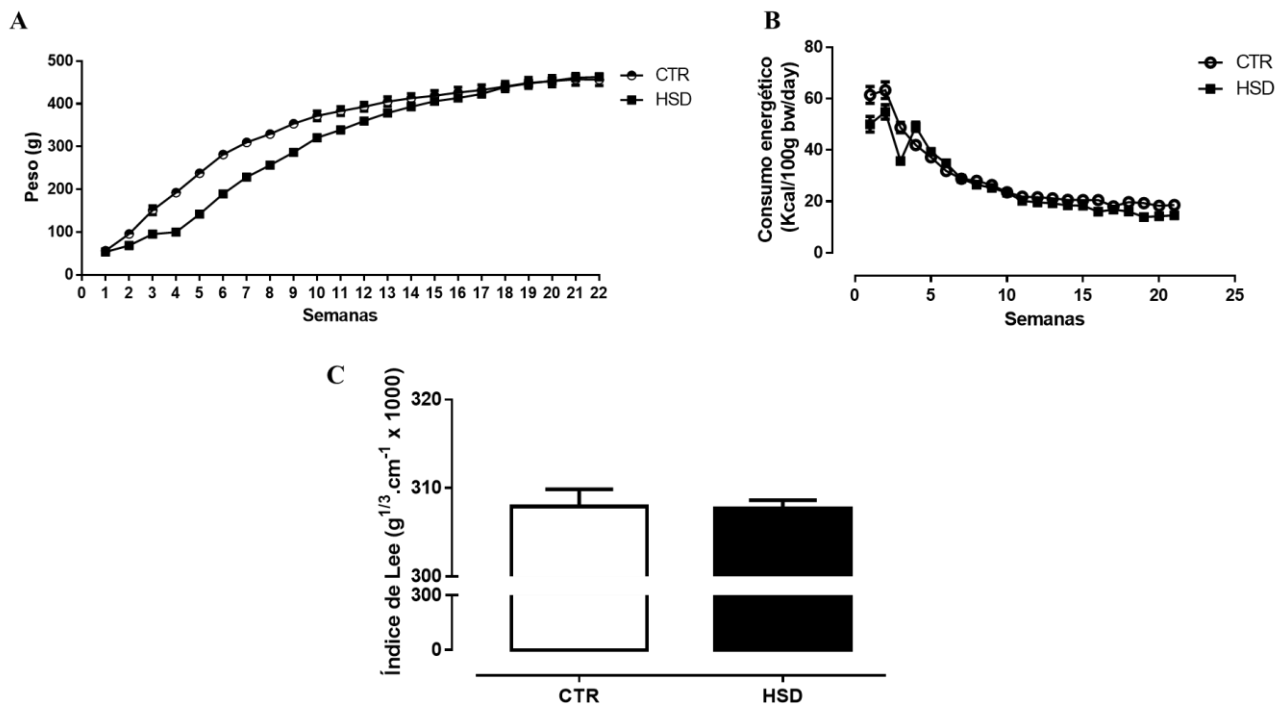
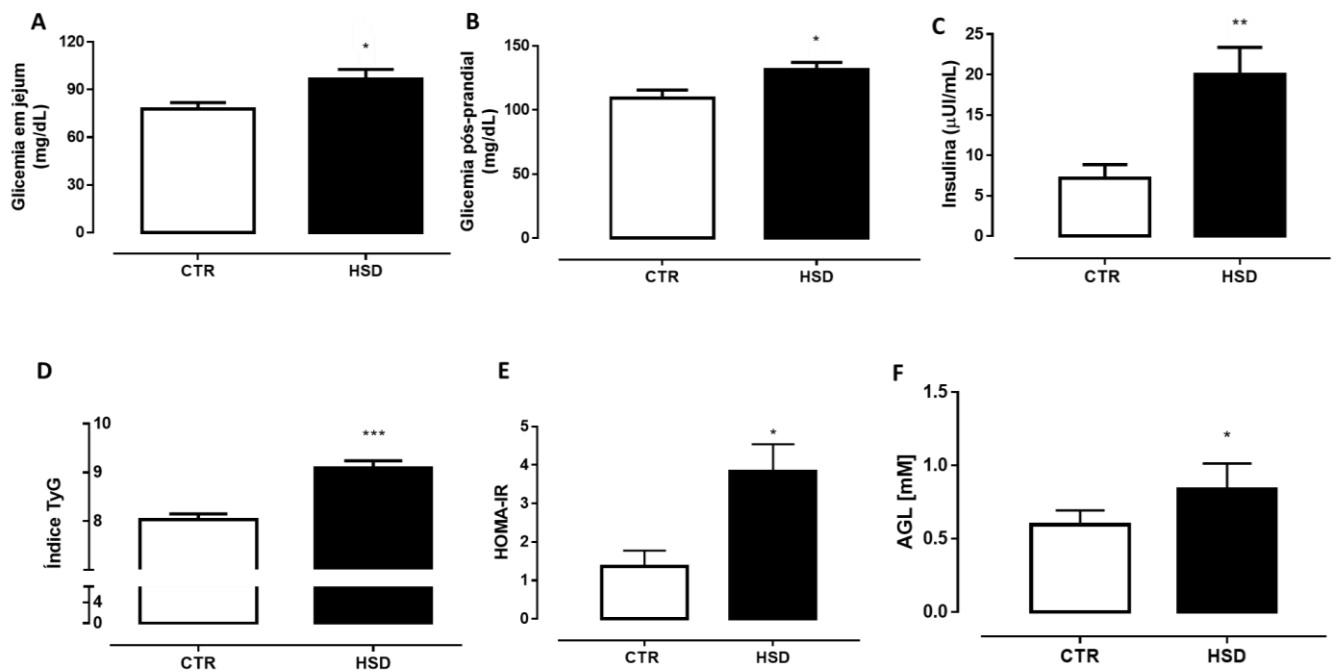


Figura 1. Parâmetros morfométricos durante o período de intervenção com a dieta. A. Peso dos animais em gramas (g). B. Consumo energético dos animais (g/100g/dia). c. Índice de Lee (IL) ( $g^{1/3}/cm^{-1} \times 1000$ ) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6) e com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8) durante 22 semanas após o desmame (21 dias). As barras representam média  $\pm$  epm. Teste t de Student não pareado.

O consumo da dieta rica em sacarose impactou negativamente na homeostase da glicose. Os animais HSD apresentaram elevados níveis de glicose em jejum ( $96,88 \pm 5,83$  mg/dL), glicose pós-prandial ( $131,1 \pm 5,95$  mg/dL) e elevados níveis de insulina ( $19,98 \pm 3,39$   $\mu$ UI/mL) quando comparado aos animais do grupo CTR ( $77,83 \pm 4,02$  mg/dL;  $109 \pm 6,53$  mg/dL;  $7,13 \pm 1,72$   $\mu$ UI/mL) (Fig. 2 A, B e C). Os animais HSD também apresentaram resistência insulínica, inferida pelos índices TyG e HOMA-IR (Fig. 2 D e E). Esses dados são corroborados pelo aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres ( $0,84 \pm 0,06$  mg/dL) nos animais HSD quando comparados aos animais do grupo CTR ( $81,80 \pm 8,60$ ;  $0,59 \pm 0,04$  mg/dL) (Fig. 2 F).



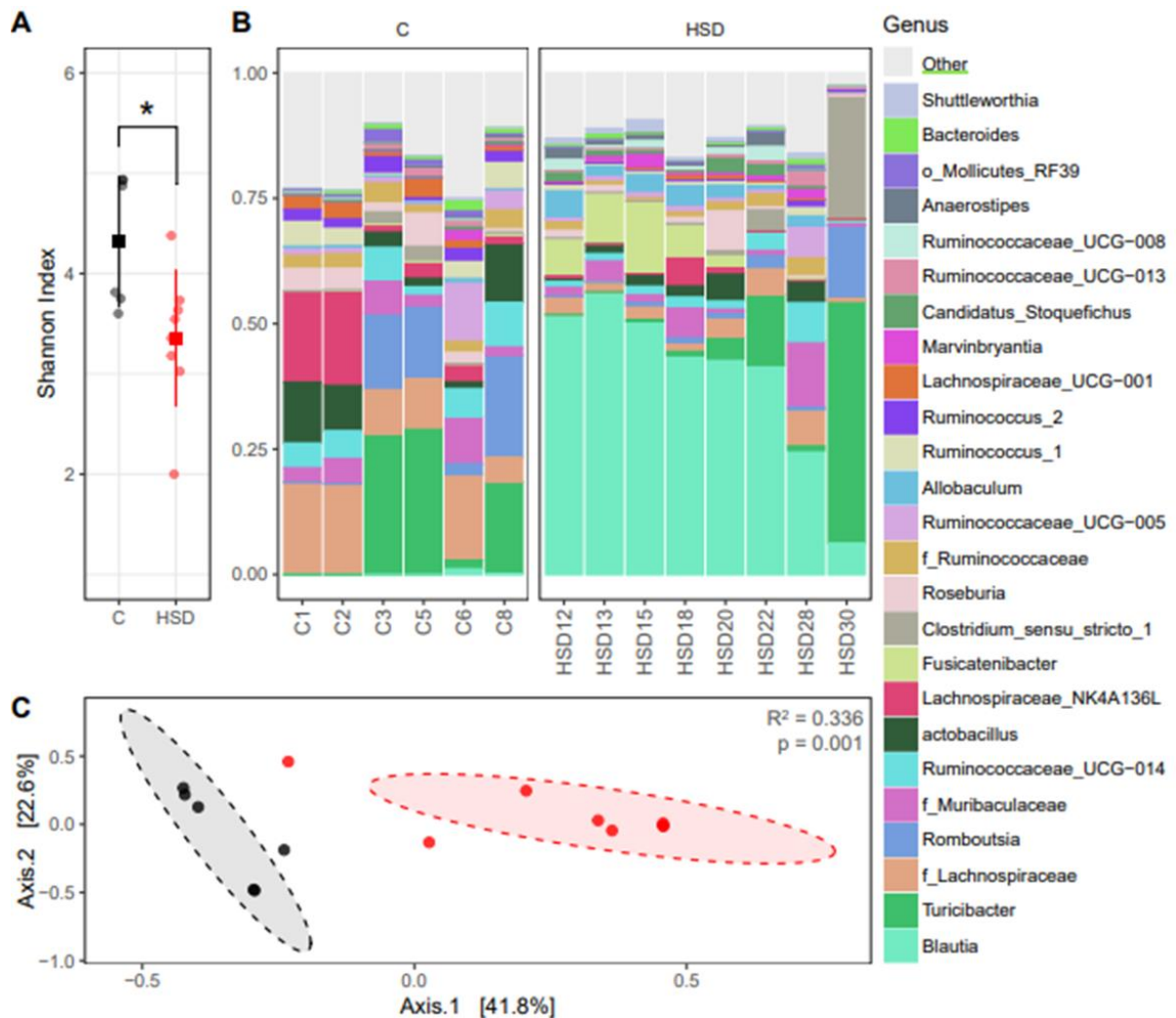
**Figura 2. Perfil bioquímico e resistência insulínica.** Níveis glicêmicos séricos (mg/dL) em jejum (A) e pós-prandial (B). Níveis séricos de insulina ( $\mu$ IU/ml) (C). Índice TyG (D). Índice HOMA-IR (E). Níveis séricos de ácidos graxos livres (F) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6) e com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8) durante 22 semanas após o desmame (21 dias). As barras representam média  $\pm$  epm. Teste *t* de Student não pareado. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

A partir da observação desse conjunto de dados, podemos observar que a introdução precoce de uma dieta rica em sacarose promove o desenvolvimento de fatores de riscos associados com a síndrome metabólica, dislipidemia e resistência insulínica.

## **A exposição a dieta promove mudanças na microbiota intestinal e induz a produção de AGCC**

A dieta rica em sacarose reduz significativamente a alfa diversidade mensurada pelo índice de Shannon ( $p = 0.02311$ ). Esse dado sugere que os animais HSD (Vermelho) apresentaram ambos pouca e/ou menor distribuição de espécies bacterianas comparado aos animais CTR (preto) (Fig. 3 A). De acordo com a análise dos 25 gêneros mais abundantes, a dieta rica em sacarose foi capaz de modificar a composição da microbiota intestinal (Fig. 3 B). O impacto da dieta sobre as comunidades microbianas da microbiota intestinal visualizadas pela análise das principais coordenadas (PCoA) usando a métrica de dissimilaridade de Bray-Curtis nos animais CTR (preto) ou HSD (vermelho), mostrou que os animais se agrupam claramente de acordo com a dieta ( $R^2 = 0,336$ ,  $p = 0.001$  by PERMANOVA) (Fig. 3 C).

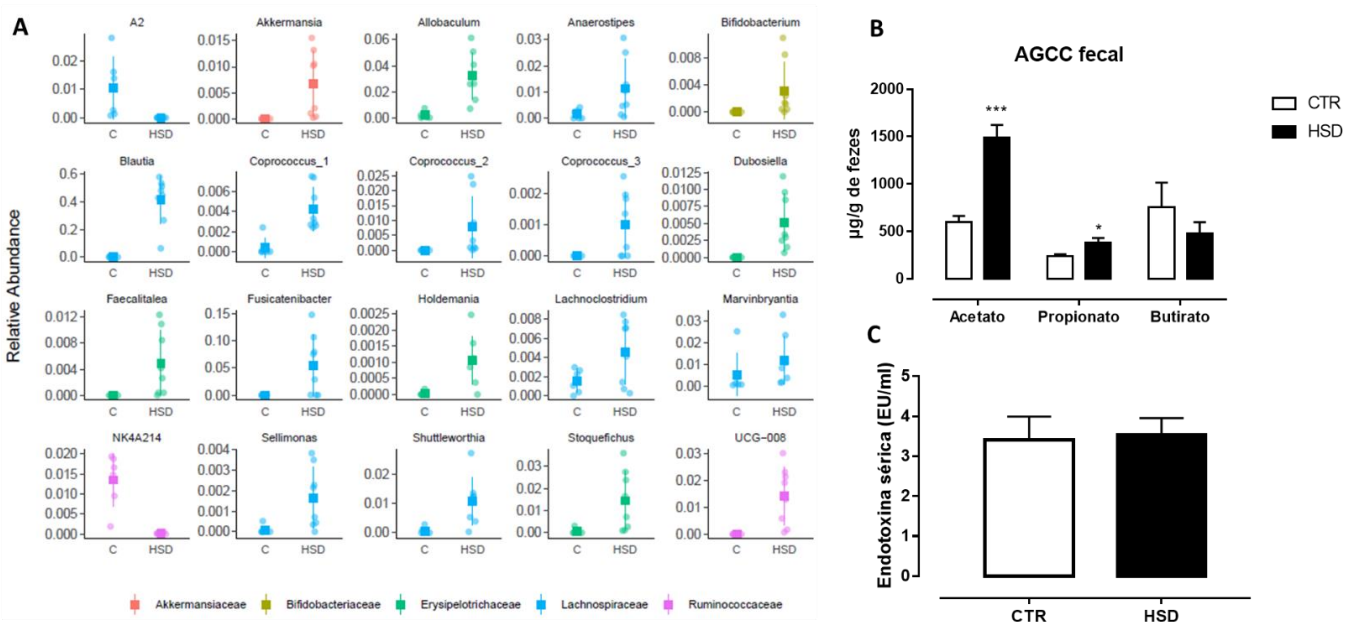




**Figura 3.** Avaliação da microbiota intestinal. Alfa diversidade calculada pelo Índice de Shannon (A). Abundância relativa dos 25 gêneros mais abundantes (B). Análise das principais coordenadas (PCoA) usando o índice de dissimilaridade de Bray curtis ( $R^2 = 0.336$ ,  $p = 0.001$  by PERMANOVA) (C) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6) e com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8) após 22 semanas de intervenção.

Os gráficos abaixo representam a relativa abundância de gêneros que significativamente são alterados pela dieta HSD quando comparados ao grupo CTR. A maioria dos gêneros são pertencentes a família *Lachnospiraceae*, que inclui membros produtores de AGCC, particularmente butirato e acetato (especialmente espécies do gênero *Blautia*). O único gênero que diminuiu foi o A2. É especialmente interessante a abundância aumentada de *Akkermansia*, uma conhecida bactéria que degrada mucina e está envolvida com a imunidade e a função de barreira do epitélio intestinal (Fig. 4 A). Os AGCC, principalmente, acetato, propionato e

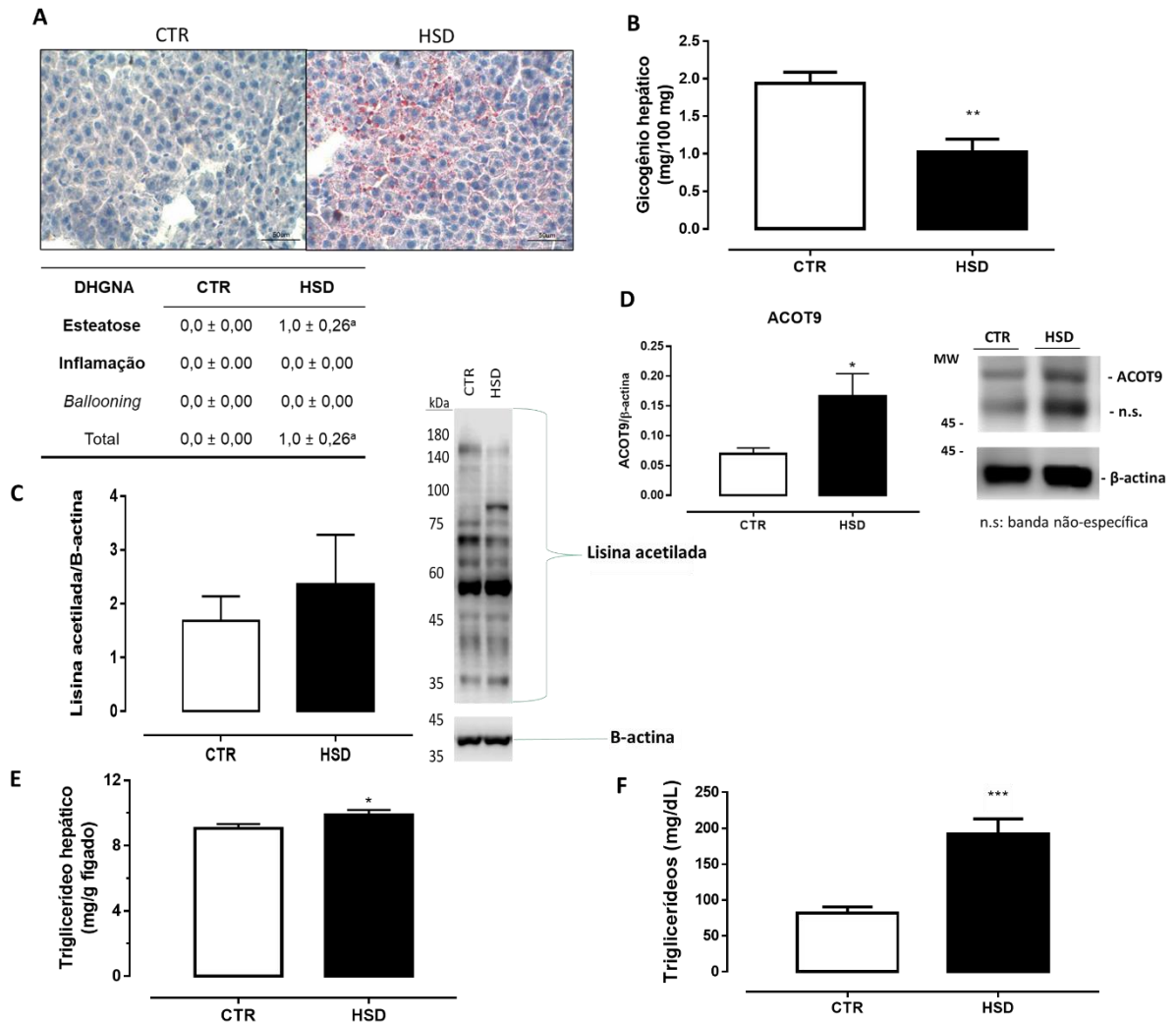
butirato são produzidos pela microbiota intestinal. Como mostrado na Fig. 4B, nós observamos que os níveis de acetato e propionato foram elevados nas fezes dos animais HSD. Nestes animais a produção de acetato e propionato foram, respectivamente, 150% e 62% maiores quando comparados aos níveis observados nos animais do grupo CTR. Entretanto, nenhuma diferença foi observada com relação aos níveis de butirato entre os animais HSD e CTR. Quanto a avaliação do LPS circulante, pode-se observar que não houve diferenças entre os animais CTR e os animais HSD (Fig. 4 C).



**Figura 4.** Abundância relativa dos gêneros mais alterados pela dieta HSD (A). Concentração de AGCC nas fezes (B). Endotoxina sérica (C) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6) e com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8) após 22 semanas de intervenção. As barras representam média  $\pm$  epm. Teste *t* de Student não pareado. \*  $p < 0.05$  \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Exposição a dieta rica em sacarose promove acúmulo de lipídios e redução do conteúdo de glicogênio no fígado**

Após 150 dias de exposição a dieta, os animais HSD apresentaram esteatose hepática quando comparados aos animais CTR (Fig. 5A).



**Figura 5.** Análise histológica do fígado após o período de intervenção com a dieta. Secções de amostras de fígado coradas com Oil Red para a visualização de *droplets* de lipídios, morfologia de hepatócitos, score para esteatose, ballooning e inflamação avaliados em ratos do grupo CTR (n=6) e HSD (n=8) (A). Conteúdo de glicogênio hepático (B). Expressão proteica da Acot9(C) e avaliação da acetilação total de proteínas por Western blotting (D). Níveis hepático (E) e séricos (F) de triglicerídeos após 22 semanas de intervenção. As barras representam média ± epm. Teste *t* de Student não pareado. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ .

O acúmulo excessivo de lipídios no hepatócito pode causar resistência insulínica hepática, comprometendo, assim, a biossíntese de glicogênio. Nesse contexto, o conteúdo de

glicogênio é reduzido no fígado. Foi observado que o conteúdo de glicogênio hepático foi reduzido nos animais HSD comparado aos animais CTR ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5B).

A acetilação de lisina é envolvida em várias vias celulares, sendo crucial para a ativação e desativação dessas vias. De acordo com a avaliação da expressão total de proteínas acetiladas no fígado, nenhuma diferença foi observada entre os animais HSD comparados aos animais do grupo CTR (Fig. 5C). Por isso, resolvemos avaliar a expressão da Acot9 nesse mesmo tecido. Essa proteína foi recentemente envolvida no tráfico de acetil-CoA para o interior da mitocôndria, limitando assim, a disponibilidade de acetil-CoA para os processos de acetilação de proteínas no fígado. Observamos que a expressão da Acot9 foi aumentada em 140% nos animais HSD em relação aos animais CTR (Fig. 5D). Dessa forma, podemos sugerir que a expressão aumentada da dessa proteína esteja inibindo o processo de acetilação proteica no tecido hepático. Além disso, a expressão aumentada da Acot9, favorece o aumento de substratos para a lipogênese *de novo*, contribuindo para a ocorrência da esteatose hepática. Para corroborar com esse resultado, observamos o aumento dos níveis de triglicerídeos hepáticos (Fig. 5E) e séricos (Fig. 5F) nos animais HSD em comparação aos animais CTR.

## DISCUSSÃO

O nosso estudo mostra que a dieta rica em sacarose (HSD) foi capaz de promover alterações na composição da microbiota intestinal de ratos. Mais precisamente, observamos que a dieta favoreceu a proliferação de alguns grupos específicos de bactérias, modificando a abundância de grupos pertencentes ao Filo Firmicutes que, por sua vez, vem sendo associado ao desenvolvimento de obesidade (Ley, Backhed, et al. 2005; Turnbaugh et al. 2007) e outras desordens metabólicas como a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) (Le Roy et al. 2013).

A ingestão de HSD com 25% de sacarose por 22 semanas favoreceu à proliferação de gêneros bacterianos específicos como, *Blautia* e *Fusicatenibacter*, ambos pertencentes à família *Lachnospiraceae*, filo Firmicutes. A família *Lachnospiraceae* é um dos principais grupos taxonômicos constituintes da microbiota intestinal, sendo responsável pela degradação de polissacarídeos complexos e, assim, gerando metabólitos derivados dessa ação bacteriana como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). As espécies componentes desse grupo bacteriano também apresentam a capacidade de fermentar uma grande variedade de substratos orgânicos na região do cólon (Ejtahed et al. 2020). Em estudo realizado com pacientes, para avaliar o impacto da suplementação com leite integral sobre a microbiota intestinal, foi observado que indivíduos com dificuldade em digerir a lactose apresentaram um aumento na abundância de bactérias dos gêneros *Anaerostipes* e *Blautia* (família *Lachnospiraceae*), evidenciando, assim, a participação dessas espécies no processo de fermentação da lactose (Li et al. 2018).

Outros estudos encontraram associação entre o aumento na abundância de espécies do gênero *Blautia* e desordens metabólicas como, a obesidade, elevado BMI (Kasai et al. 2015; Bonder et al. 2016; Org et al. 2017) e acúmulo de gordura visceral (Ozato et al. 2019). Este gênero foi positivamente correlacionado com a presença de ácidos graxos saturados (SFAs) e ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) (Org et al. 2017), triglicerídeos, ácidos graxos não-esterificados (NEFA) e níveis séricos de malondialdeído (MDA) (Yang, Deng, et al. 2019). Um estudo realizado com pacientes diagnosticados com DHGNA, demonstrou um aumento na abundância de espécies da família *Lachnospiraceae*, com particular aumento de cerca de duas vezes mais espécies do gênero *Blautia*, nesses pacientes, em comparação com os indivíduos do grupo controle. Nesse mesmo estudo, pacientes diagnosticados EHNA também apresentaram elevada abundância de espécies do gênero *Blautia* (Shen, Zheng, et al. 2017). Resultados semelhantes foram observados por Raman et al. (2013), em que pacientes obesos e com DHGNA apresentaram aumento na abundância de espécies da família *Lachnospiraceae*

(Raman et al. 2013). Em outro estudo realizado com crianças diagnosticadas com EHNA, o aumento na abundância de *Blautia* foi também observado (Del Chierico et al. 2017). Em nosso estudo, os animais HSD apresentaram, por exemplo, esteatose hepática, elevados níveis de triglicerídeos e ácidos graxos livres no soro.

Corroborando com os nossos resultados, outros estudos demonstraram que a adição de açúcares simples à dieta modifica a composição da microbiota intestinal. Neves et al. (2020) observaram que ratos *Wistar* alimentados com uma dieta rica em açúcar (36, 32% do conteúdo de carboidratos foi referente à adição de sacarose) por 15 semanas, apresentaram modificações profundas na composição da microbiota intestinal, principalmente relacionado ao aumento da abundância de sub-classes pertencentes ao filo Proteobacteria, grupos esses associados ao desenvolvimento de desordens metabólicas como a obesidade (de Oliveira Neves et al. 2020). Um outro estudo demonstrou que camundongos alimentados com uma dieta rica em glicose ou frutose (65.0% do total de calorias referente a carboidratos - 85% de glicose ou frutose e 15% de sacarose) por 12 semanas, apresentaram redução na diversidade bacteriana caracterizada pela redução na abundância de espécies do filo Bacteroidetes e aumento na abundância de Proteobacteria (Do et al. 2018).

Fastjova et al. (2020) observaram que fêmeas BALB/c alimentadas com dieta rica em açúcar (46,4% sacarose; 7% dextrose) por 3 semanas, sofreram mudanças na composição da microbiota intestinal associadas ao aumento na abundância de espécies da família *Enterococcaceae* e do gênero *Turicibacter*, ambos pertencentes ao filo Firmicutes. Além disso, a associação da dieta rica em açúcar com o sódio de sulfato de dextrano (DSS) para a indução de colite, favoreceu a proliferação de *E. coli* e fungos do gênero *Candida*, evidenciando assim, a influência da dieta na promoção do crescimento de espécies bacterianas e fúngicas potencialmente patogênicas (Fajstova et al. 2020). Em outro estudo, também com indução de colite por DSS, a administração de 10% de sacarose por 7 dias, promoveu o aumento da

abundância de Bacteroidetes e Proteobacteria, com redução de espécies das famílias *Lactobacillaceae* and *Lachnospiraceae*. Foi também observado o aumento na abundância de espécies da família *Akkermansiaceae* (Khan et al. 2020).

No presente estudo, os animais HSD apresentaram aumento na abundância de *Akkermansia muciniphila* e redução de espécies do gênero *Lactobacillus*. Apesar de estudos recentes relatarem efeitos benéficos associados a abundância da *A. muciniphila* em relação ao controle de desordens metabólicas, redução do acúmulo de gorduras e ganho de peso (Chevalier et al. 2015; Derrien, Belzer, and de Vos 2017; Macchione et al. 2019), existem algumas evidências de que o aumento na abundância dessa espécie esteja associada a promoção da colite (Desai et al. 2016; Seregin et al. 2017). Khan et al. (2020) sugerem que a redução da camada de muco observada no intestino dos animais alimentados com dieta rica em açúcar está associada ao aumento da abundância de *A. muciniphila* nesses animais, tendo em vista que essa espécie degrada a mucina presente no muco (Khan et al. 2020). Dessa forma, com a redução da camada de muco, bactérias patogênicas podem se aproximar do epitélio intestinal provocando infecções (Desai et al. 2016).

*Lactobacillus* spp. são associadas a manutenção da homeostase intestinal induzindo, por exemplo, a produção de citocinas anti-inflamatórias e inibindo a proliferação de bactérias patogênicas no epitélio intestinal (Becker, Neurath, and Wirtz 2015). Espécies do gênero *Lactobacillus* são frequentemente usadas como probióticos em humanos, como uma alternativa interessante no tratamento da obesidade, síndrome metabólica e processos inflamatórios crônicos associados a modificação da dieta e do estilo de vida (Tenorio-Jiménez et al. 2019). Estudos com ratos mostraram que a suplementação da dieta com linhagens da espécie *Lactobacillus (L.) reuteri* foi capaz de reduzir a hipercolesterolemia dos animais, além de normalizar os níveis glicêmicos (Singh et al. 2015; Otero et al. 2017). Em camundongos não-diabéticos alimentados com dieta rica em gordura, a administração de *L. rhamnosus* por 13

semanas foi capaz de promover a melhora no controle glicêmico, aumentando a sensibilidade a insulina e a expressão de GLUT4, além do aumento da produção de adiponectina (Kim et al. 2013). Resultados semelhantes foram observados em ratos alimentados com dieta rica em frutose e com administração de *L. reuteri* por 14 semanas, onde ocorreu melhora na resistência insulínica e da esteatose hepática após a intervenção com este probiótico (Hsieh et al. 2013). Estudos com o uso dessas linhagens probióticas de *Lactobacillus* em humanos apresentaram resultados semelhantes ao encontrado em animais (Luoto et al. 2010; Ejtahed et al. 2011; Simon et al. 2015).

Alterações na composição da microbiota intestinal pode contribuir para a endotoxemia metabólica. Dessa forma, as bactérias constituintes da microbiota intestinal são tidas como fontes importantes de LPS e começaram a ser investigadas como uma possível causa para a endotoxemia metabólica (Fuke et al. 2019). Estudos com dietas enriquecidas com açúcar tem demonstrado associação entre a disbiose da microbiota intestinal e aumento de LPS na circulação. Animais alimentados com dieta rica em glicose ou frutose, apresentaram mudanças na microbiota intestinal, principalmente associada ao aumento da abundância de espécies do filo Proteobacteria, onde as bactérias constituintes desse filo são Gram-negativas. Foram observados aumento de LPS circulante e da permeabilidade intestinal, sendo assim, constatado a relação entre a dieta e a disbiose como causa da endotoxemia e inflamação do cólon, contribuindo também, para a promoção de desordens metabólicas (Do et al. 2018). Prajapati et al. (2015) observaram um aumento de cerca de 72% de bactérias do filo Proteobacteria em ratos alimentados com dieta rica em açúcar. Os autores sugerem que o significativo aumento na abundância de bactérias Gram-negativas estaria associado ao aumento dos níveis de LPS no plasma dos animais (Prajapati et al. 2015).

Em nosso estudo não observamos diferença quanto aos níveis circulantes de LPS nos animais HSD em comparação aos animais do grupo controle. Diferente dos trabalhos citados



acima, em nosso estudo observamos aumento na abundância de grupos do filo Firmicutes, onde a maioria das espécies são Gram-positivas. O aumento dos níveis circulantes de LPS tem sido também associado a alterações no epitélio intestinal que promovem o aumento da permeabilidade do mesmo (Fuke et al. 2019). Em nossa pesquisa não avaliamos o efeito da dieta rica em sacarose sobre o epitélio intestinal.

Componentes da dieta que não são completamente digeridos são fermentados por bactérias anaeróbicas no intestino grosso. Como subprodutos desse processo de fermentação são gerados gases e ácidos orgânicos, particularmente três principais ácidos graxos de cadeia curta: acetato, propionato e butirato (Louis, Hold, and Flint 2014). Nossos dados mostram que a concentração de acetato e propionato nas fezes de animais HSD aumentaram 150% e 62%, respectivamente, em comparação aos animais do grupo controle. Não foram observadas diferenças na concentração de butirato nos animais HSD. A produção de AGCC varia de acordo com a composição da microbiota intestinal e condições ambientais do intestino, incluindo pH e disponibilidade de substrato (Louis, Hold, and Flint 2014). Tem sido sugerido que carboidratos não-digeríveis como as fibras vegetais, são o principal substrato para a produção de AGCC pela microbiota intestinal. Porém, alguns carboidratos digeríveis como os açúcares, podem modular a produção dessas substâncias (Singh et al. 2017; Sánchez-Tapia et al. 2020).

As vias de produção de acetato são amplamente distribuídas entre vários grupos bacterianos, incluindo bactérias acetogênicas, enquanto as vias de produção de propionato e butirato são mais específicas (Morrison and Preston 2016). Como já citado anteriormente, em nossa pesquisa observamos aumento na abundância de espécies da família *Lachnospiraceae*, principalmente espécies dos gêneros *Blautia*, *Coprococcus* e *Fusicatenibacter* nas fezes dos animais HSD. Algumas espécies do gênero *Blautia* são acetogênicas e estão envolvidas na produção do acetato a partir de gases como o H<sub>2</sub> e o CO<sub>2</sub> ou então, a partir do formato pela via Wood-Ljungdahl (Canfora et al. 2019). Além disso, espécies

da família *Lachnospiraceae*, presentes em amostras de fezes humanas, foram associadas a produtos resultantes da fermentação de hexoses, entre eles, formato, acetato, lactato e succinato (Louis et al. 2007). Laffin et al. (2019) reportaram que animais alimentados com dieta rica em açúcar por 2 dias, rapidamente sofreram modificações na composição da microbiota intestinal com redução significativa na concentração de AGCC cecal, com particular redução do acetato. Os autores sugerem que esse resultado estaria associado a significativa redução da abundância de espécies da família *Lachnospiraceae*, conhecidas como produtoras de butirato e acetato (Laffin et al. 2019).

Os AGCC são rapidamente absorvidos do lúmen do intestino e, em seguida, são distribuídos podendo atuar nos mais diferentes órgãos e células do hospedeiro, exercendo também efeitos metabólicos diferentes. O butirato é basicamente utilizado como substrato energético pelos colonócitos, enquanto o propionato ao ser liberado do lúmen do intestino segue para o fígado, através da veia porta, onde será altamente metabolizado. Já o acetato, por não ser muito metabolizado pelo fígado, acaba alcançando concentrações maiores na circulação periférica (Louis, Hold, and Flint 2014; Canfora et al. 2019).

Embora os AGCC venham sendo associados com efeitos metabólicos benéficos e perda de peso, a produção dessas substâncias envolve processos de maior extração de energia dos nutrientes e, dessa forma, fornecendo energia extra para o hospedeiro, os AGCC são associados, por exemplo, ao ganho de peso (Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, and Backhed 2016; Aron-Wisnewsky et al. 2020). Concentrações elevadas de AGCC foram encontradas em amostras de fezes de pacientes obesos (Schwiertz, Taras, Schäfer, et al. 2010; Rahat-Rozenbloom et al. 2014). Em um outro estudo também com humanos, pacientes com a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) apresentaram concentrações elevadas de acetato, propionato e butirato nas fezes. Além disso, os autores do estudo sugerem que a concentração elevada de acetato e propionato nas fezes desses pacientes podem contribuir para o

desenvolvimento da esteato hepatite não-alcoólica (EHNA) (Rau et al. 2018). Nossos dados mostram que os animais alimentados com a dieta rica em sacarose apresentaram esteatose hepática. Esse dado é corroborado por um outro estudo em que o consumo de sacarose foi associado ao aumento na concentração total de AGCC nas fezes de ratos *Wistar*, particularmente o acetato, sendo este relacionado ao desenvolvimento da esteatose hepática nos animais (Sánchez-Tapia et al. 2020).

Ácidos graxos de cadeia curta são substratos para o metabolismo energético do hospedeiro, fornecendo energia adicional através da sua participação em processos como a lipogênese e a gliconeogênese. den Besten et al. (2013) investigaram a possível participação dos diferentes AGCC em diferentes vias bioquímicas. Assim, foi avaliada a participação deles na síntese hepática de diferentes ácidos graxos como os ácidos graxos livres e os triglicerídeos. Para isso, os autores realizaram infusão de AGCC, marcados com isótopos, diretamente no cecum de camundongos. Como resultado, foi demonstrado que o acetato e o butirato foram utilizados como substratos para a síntese de ácidos graxos livres e triglicerídeos (den Besten, Lange, et al. 2013).

Em nosso estudo, os animais HSD apresentaram concentrações elevadas de ácidos graxos livres e triglicerídeos. Dados esses que podem estar relacionados à concentração elevada de acetato nas fezes desses animais. Em um outro estudo realizado com camundongos *germ-free*, os animais alimentados com dieta rica em polissacarídeos e colonizados com linhagens bacterianas fermentadoras, apresentaram um aumento de AGCC nas fezes. Os autores sugerem que os AGCC foram utilizados como substrato para a lipogênese *de novo* hepática, tendo em vista que os animais apresentaram níveis de triglicerídeos hepáticos aumentados (Samuel et al. 2008).

Dietas ricas em carboidratos contribuem para uma maior produção de metabólitos envolvidos em processos de acetilação de proteínas, como a acetil-CoA. A acetilação controla

o metabolismo energético diretamente, pela alteração na função de enzimas envolvidas no metabolismo, ou indiretamente, via regulação epigenética, alterando a expressão de genes codificantes dessas enzimas (Arias-Alvarado et al. 2021). O aumento da disponibilidade de acetil-CoA proveniente da glicólise foi associado a hiper acetilação de proteínas mitocondriais do fígado (Meyer et al. 2018). Resultados semelhantes foram observados em um estudo onde o excesso de calorias proporcionadas pela suplementação com frutose e glicose por 10 semanas, promoveu o aumento da acetilação de proteínas mitocondriais envolvidas na via de oxidação de ácidos graxos, alterando essa função hepática (Softic et al. 2019). Além de ser proveniente do metabolismo de carboidratos, a acetil-CoA pode ser também produzida a partir de AGCC resultantes do metabolismo da microbiota intestinal, particularmente o acetato (Menzies et al. 2016; Krautkramer et al. 2016).

A partir dos dados da literatura sobre o papel dos açúcares e do acetato em promover o aumento da disponibilidade de acetil-CoA, avaliamos a acetilação total de proteínas em células do fígado. Observamos que houve diferenças, quanto ao perfil de acetilação dessas proteínas entre os animais HSD e os animais do grupo controle. Essa diferença não foi estatisticamente significativa, porém observou-se uma tendência para o aumento da acetilação de proteínas no grupo HSD.

Um estudo recente investigou o papel de uma proteína mitocondrial chamada acil-CoA tioesterase (Acot9) no tecido hepático, envolvida no transporte de acetil-CoA para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), aumentando a biossíntese de substratos para a lipogênese *de novo* e a produção hepática de glicose. Os autores do estudo mostraram que os animais que apresentavam expressão normal da Acot9 nos hepatócitos desenvolveram esteatose hepática associada ao aumento dos níveis de triglicerídeos hepáticos e aumento na produção de glicose hepática. Além disso, animais *knockout* para a Acot9 apresentavam maiores níveis de acetilação de proteínas hepáticas ao contrário dos animais com a expressão normal desta proteína. Os

autores sugerem que a presença da Acot9 acaba sendo um fator limitante da disponibilidade de acetil-CoA para os processos de acetilação de proteínas (Steensels et al. 2020).

Baseado nos dados citados no estudo acima, nós avaliamos a expressão da Acot9 no fígado dos animais dos grupos CTR e HSD. Observamos que os animais HSD apresentaram uma maior expressão dessa proteína e, portanto, sugerimos que a presença da Acot9 foi um fator limitante para o aumento significativo do perfil de acetilação de proteínas no fígado desses animais. Corroborando ainda com esse dado, podemos enfatizar a presença da esteatose hepática com conseqüente aumento dos níveis de triglicerídeos apresentados pelos animais HSD.

Em conclusão, nossos resultados indicam que o consumo crônico de uma dieta rica em sacarose iniciado logo após o desmame promove alterações significativas na microbiota intestinal, reduzindo a diversidade bacteriana e favorecendo o crescimento de grupos bacterianos associados com o aumento da produção de AGCC e ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos associados à SM. Nossos dados corroboram os achados de outros estudos que também mostram que o consumo de açúcares de adição reduz a diversidade bacteriana, reforçando a hipótese de que a baixa diversidade microbiana pode afetar o metabolismo energético do hospedeiro (Alcock, Maley, and Aktipis 2014). Importante destacar que o nosso modelo de dieta tem em sua composição uma quantidade de sacarose semelhante a quantidade energética ingerida diariamente pela população de países Latino-Americanos (Fisberg et al. 2018). Além disso, nosso estudo evidencia uma possível interação entre a expressão aumentada de Acot9 com a redução da acetilação de proteínas no fígado e o aumento da disponibilidade de substratos para a lipogênese *de novo*, evidenciados pelo aumento do TG hepático e sérico, como também a ocorrência de esteatose hepática nos animais HSD, corroborando assim, com os resultados publicados por Steensels et al. (2020) (Steensels et al. 2020).

## Referências

- Alberti, K. G., R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, C. M. Loria, and S. C. Smith, Jr. 2009. "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* 120 (16):1640-5. doi: 10.1161/circulationaha.109.192644.
- Alcock, J., C. C. Maley, and C. A. Aktipis. 2014. "Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms." *Bioessays* 36 (10):940-9. doi: 10.1002/bies.201400071.
- Arenaza, L., M. Medrano, M. Oses, I. Huybrechts, I. Díez, H. Henriksson, and I. Labayen. 2019. "Dietary determinants of hepatic fat content and insulin resistance in overweight/obese children: a cross-sectional analysis of the Prevention of Diabetes in Kids (PREDIKID) study." *Br J Nutr* 121 (10):1158-65. doi: 10.1017/s0007114519000436.
- Arias-Alvarado, A., M. Aghayev, S. Ilchenko, N. Rachdaoui, J. Lepp, T. H. Tsai, G. F. Zhang, S. Previs, and T. Kasumov. 2021. "Measuring acetyl-CoA and acetylated histone turnover in vivo: Effect of a high fat diet." *Anal Biochem* 615:114067. doi: 10.1016/j.ab.2020.114067.
- Aron-Wisniewsky, J., C. Vigliotti, J. Witjes, P. Le, A. G. Holleboom, J. Verheij, M. Nieuwdorp, and K. Clément. 2020. "Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17 (5):279-97. doi: 10.1038/s41575-020-0269-9.
- Bartram, A. K., M. D. Lynch, J. C. Stearns, G. Moreno-Hagelsieb, and J. D. Neufeld. 2011. "Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads." *Appl Environ Microbiol* 77 (11):3846-52. doi: 10.1128/aem.02772-10.
- Becker, C., M. F. Neurath, and S. Wirtz. 2015. "The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease." *Ilar j* 56 (2):192-204. doi: 10.1093/ilar/ilv030.
- Bernardis, L. L., and B. D. Patterson. 1968. "Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions." *J Endocrinol* 40 (4):527-8. doi: 10.1677/joe.0.0400527.
- Bhattarai, Y., D. A. Muniz Pedrego, and P. C. Kashyap. 2017. "Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder?" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312 (1):G52-g62. doi: 10.1152/ajpgi.00338.2016.
- Bonder, M. J., A. Kurilshikov, E. F. Tigchelaar, Z. Mujagic, F. Imhann, A. V. Vila, P. Deelen, et al. 2016. "The effect of host genetics on the gut microbiome." *Nat Genet* 48 (11):1407-12. doi: 10.1038/ng.3663.
- Bray, G. A., and B. M. Popkin. 2014. "Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar." *Diabetes Care* 37 (4):950-6. doi: 10.2337/dc13-2085.
- Callahan, Benjamin J, Paul J McMurdie, Michael J Rosen, Andrew W Han, Amy Jo A Johnson, and Susan P Holmes. 2016. "DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data." *Nature methods* 13 (7):581-3.
- Canfora, E. E., R. C. R. Meex, K. Venema, and E. E. Blaak. 2019. "Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM." *Nat Rev Endocrinol* 15 (5):261-73. doi: 10.1038/s41574-019-0156-z.
- Cani, P. D., M. Osto, L. Geurts, and A. Everard. 2012. "Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity." *Gut Microbes* 3 (4):279-88. doi: 10.4161/gmic.19625.
- Chevalier, C., O. Stojanović, D. J. Colin, N. Suarez-Zamorano, V. Tarallo, C. Veyrat-Durebex, D. Rigo, et al. 2015. "Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold." *Cell* 163 (6):1360-74. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.004.

- de Oliveira Neves, V. G., D. T. de Oliveira, D. C. Oliveira, L. Oliveira Perucci, T. A. P. Dos Santos, I. da Costa Fernandes, G. G. de Sousa, N. R. Barboza, and R. Guerra-Sá. 2020. "High-sugar diet intake, physical activity, and gut microbiota crosstalk: Implications for obesity in rats." *Food Sci Nutr* 8 (10):5683-95. doi: 10.1002/fsn3.1842.
- Deal, B. J., M. D. Huffman, H. Binns, and N. J. Stone. 2020. "Perspective: Childhood Obesity Requires New Strategies for Prevention." *Adv Nutr* 11 (5):1071-8. doi: 10.1093/advances/nmaa040.
- Del Chierico, F., V. Nobili, P. Vernocchi, A. Russo, C. De Stefanis, D. Gnani, C. Furlanello, et al. 2017. "Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach." *Hepatology* 65 (2):451-64. doi: 10.1002/hep.28572.
- Delzenne, N. M., C. Knudsen, M. Beaumont, J. Rodriguez, A. M. Neyrinck, and L. B. Bindels. 2019. "Contribution of the gut microbiota to the regulation of host metabolism and energy balance: a focus on the gut-liver axis." *Proc Nutr Soc* 78 (3):319-28. doi: 10.1017/s0029665118002756.
- den Besten, G., K. Lange, R. Havinga, T. H. van Dijk, A. Gerding, K. van Eunen, M. Müller, et al. 2013. "Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305 (12):G900-10. doi: 10.1152/ajpgi.00265.2013.
- Derrien, M., C. Belzer, and W. M. de Vos. 2017. "Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions." *Microb Pathog* 106:171-81. doi: 10.1016/j.micpath.2016.02.005.
- Desai, M. S., A. M. Seekatz, N. M. Koropatkin, N. Kamada, C. A. Hickey, M. Wolter, N. A. Pudlo, et al. 2016. "A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility." *Cell* 167 (5):1339-53.e21. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.043.
- Do, M. H., E. Lee, M. J. Oh, Y. Kim, and H. Y. Park. 2018. "High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change." *Nutrients* 10 (6). doi: 10.3390/nu10060761.
- Ejtahed, H. S., P. Angoorani, A. R. Soroush, S. Hasani-Ranjbar, S. D. Siadat, and B. Larijani. 2020. "Gut microbiota-derived metabolites in obesity: a systematic review." *Biosci Microbiota Food Health* 39 (3):65-76. doi: 10.12938/bmfh.2019-026.
- Ejtahed, H. S., J. Mohtadi-Nia, A. Homayouni-Rad, M. Niafar, M. Asghari-Jafarabadi, V. Mofid, and A. Akbarian-Moghari. 2011. "Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus." *J Dairy Sci* 94 (7):3288-94. doi: 10.3168/jds.2010-4128.
- Fajstova, A., N. Galanova, S. Coufal, J. Malkova, M. Kostovcik, M. Cermakova, H. Pelantova, et al. 2020. "Diet Rich in Simple Sugars Promotes Pro-Inflammatory Response via Gut Microbiota Alteration and TLR4 Signaling." *Cells* 9 (12). doi: 10.3390/cells9122701.
- Faruque, S., J. Tong, V. Lacmanovic, C. Agbonghae, D. M. Minaya, and K. Czaja. 2019. "The Dose Makes the Poison: Sugar and Obesity in the United States - a Review." *Pol J Food Nutr Sci* 69 (3):219-33. doi: 10.31883/pjfn/110735.
- Fidler Mis, N., C. Braegger, J. Bronsky, C. Campoy, M. Domellöf, N. D. Embleton, I. Hojsak, et al. 2017. "Sugar in Infants, Children and Adolescents: A Position Paper of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 65 (6):681-96. doi: 10.1097/mpg.0000000000001733.
- Fisberg, M., I. Kovalskys, G. Gómez, A. Rigotti, L. Y. C. Sanabria, M. C. Y. García, R. G. P. Torres, et al. 2018. "Total and Added Sugar Intake: Assessment in Eight Latin American Countries." *Nutrients* 10 (4). doi: 10.3390/nu10040389.
- Fuke, N., N. Nagata, H. Suganuma, and T. Ota. 2019. "Regulation of Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia with Dietary Factors." *Nutrients* 11 (10). doi: 10.3390/nu11102277.
- Guerrero-Romero, F., L. E. Simental-Mendía, M. González-Ortiz, E. Martínez-Abundis, M. G. Ramos-Zavala, S. O. Hernández-González, O. Jacques-Camarena, and M. Rodríguez-Morán. 2010. "The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp." *J Clin Endocrinol Metab* 95 (7):3347-51. doi: 10.1210/jc.2010-0288.
- Hassid, WZ, and S Abraham. 1957. "[7] Chemical procedures for analysis of polysaccharides."

- Heras-Gonzalez, L., J. A. Latorre, M. Martinez-Bebia, N. Gimenez-Blasi, F. Olea-Serrano, and M. Mariscal-Arcas. 2020. "Sugar consumption in schoolchildren from southern Spain and influence on the prevalence of obesity." *PLoS One* 15 (11):e0242602. doi: 10.1371/journal.pone.0242602.
- Hsieh, F. C., C. L. Lee, C. Y. Chai, W. T. Chen, Y. C. Lu, and C. S. Wu. 2013. "Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats." *Nutr Metab (Lond)* 10 (1):35. doi: 10.1186/1743-7075-10-35.
- Kasai, C., K. Sugimoto, I. Moritani, J. Tanaka, Y. Oya, H. Inoue, M. Tameda, et al. 2015. "Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing." *BMC Gastroenterol* 15:100. doi: 10.1186/s12876-015-0330-2.
- Khan, S., S. Waliullah, V. Godfrey, M. A. W. Khan, R. A. Ramachandran, B. L. Cantarel, C. Behrendt, L. Peng, L. V. Hooper, and H. Zaki. 2020. "Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice." *Sci Transl Med* 12 (567). doi: 10.1126/scitranslmed.aay6218.
- Kim, S. W., K. Y. Park, B. Kim, E. Kim, and C. K. Hyun. 2013. "Lactobacillus rhamnosus GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production." *Biochem Biophys Res Commun* 431 (2):258-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.121.
- Kleiner, David E, Elizabeth M Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J Contos, Oscar W Cummings, Linda D Ferrell, Yao-Chang Liu, Michael S Torbenson, and Aynur Unalp-Arida. 2005. "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 41 (6):1313-21.
- Koh, A., F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, and F. Backhed. 2016. "From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites." *Cell* 165 (6):1332-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
- Krautkramer, K. A., J. H. Kreznar, K. A. Romano, E. I. Vivas, G. A. Barrett-Wilt, M. E. Rabaglia, M. P. Keller, A. D. Attie, F. E. Rey, and J. M. Denu. 2016. "Diet-Microbiota Interactions Mediate Global Epigenetic Programming in Multiple Host Tissues." *Mol Cell* 64 (5):982-92. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.025.
- Laffin, M., R. Fedorak, A. Zalasky, H. Park, A. Gill, A. Agrawal, A. Keshteli, N. Hotte, and K. L. Madsen. 2019. "A high-sugar diet rapidly enhances susceptibility to colitis via depletion of luminal short-chain fatty acids in mice." *Sci Rep* 9 (1):12294. doi: 10.1038/s41598-019-48749-2.
- Le Roy, T., M. Llopis, P. Lepage, A. Bruneau, S. Rabot, C. Bevilacqua, P. Martin, et al. 2013. "Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice." *Gut* 62 (12):1787-94. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303816.
- Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon. 2005. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.
- Li, X., J. Yin, Y. Zhu, X. Wang, X. Hu, W. Bao, Y. Huang, et al. 2018. "Effects of Whole Milk Supplementation on Gut Microbiota and Cardiometabolic Biomarkers in Subjects with and without Lactose Malabsorption." *Nutrients* 10 (10). doi: 10.3390/nu10101403.
- Louis, P., G. L. Hold, and H. J. Flint. 2014. "The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer." *Nat Rev Microbiol* 12 (10):661-72. doi: 10.1038/nrmicro3344.
- Louis, P., K. P. Scott, S. H. Duncan, and H. J. Flint. 2007. "Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine." *J Appl Microbiol* 102 (5):1197-208. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03322.x.
- Luoto, R., K. Laitinen, M. Nermes, and E. Isolauri. 2010. "Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study." *Br J Nutr* 103 (12):1792-9. doi: 10.1017/s0007114509993898.
- Macchione, I. G., L. R. Lopetuso, G. Ianiro, M. Napoli, G. Gibiino, G. Rizzatti, V. Petito, A. Gasbarrini, and F. Scaldaferri. 2019. "Akkermansia muciniphila: key player in metabolic and gastrointestinal disorders." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23 (18):8075-83. doi: 10.26355/eurrev\_201909\_19024.



- Marra, F., and G. Svegliati-Baroni. 2018. "Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis." *J Hepatol* 68 (2):280-95. doi: 10.1016/j.jhep.2017.11.014.
- Martin, Marcel. 2011. "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads." *EMBnet. journal* 17 (1):10-2.
- Masella, Andre P, Andrea K Bartram, Jakub M Truszkowski, Daniel G Brown, and Josh D Neufeld. 2012. "PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences." *BMC bioinformatics* 13 (1):31.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner. 1985. "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." *Diabetologia* 28 (7):412-9. doi: 10.1007/bf00280883.
- Menzies, K. J., H. Zhang, E. Katsyuba, and J. Auwerx. 2016. "Protein acetylation in metabolism - metabolites and cofactors." *Nat Rev Endocrinol* 12 (1):43-60. doi: 10.1038/nrendo.2015.181.
- Meyer, J. G., S. Softic, N. Basisty, M. J. Rardin, E. Verdin, B. W. Gibson, O. Ilkayeva, C. B. Newgard, C. R. Kahn, and B. Schilling. 2018. "Temporal dynamics of liver mitochondrial protein acetylation and succinylation and metabolites due to high fat diet and/or excess glucose or fructose." *PLoS One* 13 (12):e0208973. doi: 10.1371/journal.pone.0208973.
- Moon, J., H. J. Do, O. Y. Kim, and M. J. Shin. 2013. "Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats." *Food Chem Toxicol* 58:347-54. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.006.
- Morrison, D. J., and T. Preston. 2016. "Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism." *Gut Microbes* 7 (3):189-200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
- Newens, K. J., and J. Walton. 2016. "A review of sugar consumption from nationally representative dietary surveys across the world." *J Hum Nutr Diet* 29 (2):225-40. doi: 10.1111/jhn.12338.
- Nolan, P. B., G. Carrick-Ranson, J. W. Stinear, S. A. Reading, and L. C. Dalleck. 2017. "Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis." *Prev Med Rep* 7:211-5. doi: 10.1016/j.pmedr.2017.07.004.
- Org, E., Y. Blum, S. Kasela, M. Mehrabian, J. Kuusisto, A. J. Kangas, P. Soininen, et al. 2017. "Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort." *Genome Biol* 18 (1):70. doi: 10.1186/s13059-017-1194-2.
- Organization, World Health. 2015. *Guideline: sugars intake for adults and children*: World Health Organization.
- Otero, Ana Isabel Sañudo, Raquel Criado García, Alba Rodríguez Nogales, Alberto Garach Domech, Mónica Olivares Martín, Julio Juan Gálvez Peralta, Santiago De La Escalera Huerzo, Juan Manuel Duarte Pérez, Antonio Zarzuelo Zurita, and Óscar Bañuelos Hortigüela. 2017. "Probiotic strains having cholesterol absorbing capacity, methods and uses thereof." In.: Google Patents.
- Ozato, N., S. Saito, T. Yamaguchi, M. Katashima, I. Tokuda, K. Sawada, Y. Katsuragi, et al. 2019. "Blautia genus associated with visceral fat accumulation in adults 20-76 years of age." *NPJ Biofilms Microbiomes* 5 (1):28. doi: 10.1038/s41522-019-0101-x.
- Pascale, A., N. Marchesi, S. Govoni, A. Coppola, and C. Gazzaruso. 2019. "The role of gut microbiota in obesity, diabetes mellitus, and effect of metformin: new insights into old diseases." *Curr Opin Pharmacol* 49:1-5. doi: 10.1016/j.coph.2019.03.011.
- Pinto, B. A., T. M. Melo, K. F. Flister, L. M. França, D. Kajihara, L. Y. Tanaka, F. R. Laurindo, and A. M. Paes. 2016. "Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats." *Metab Brain Dis* 31 (4):917-27. doi: 10.1007/s11011-016-9830-1.
- Prajapati, B., P. Rajput, P. K. Jena, and S. Seshadri. 2015. "Investigation of Chitosan for Prevention of Diabetic Progression Through Gut Microbiota Alteration in Sugar Rich Diet Induced Diabetic Rats." *Curr Pharm Biotechnol* 17 (2):173-84. doi: 10.2174/1389201017666151029110505.
- Rahat-Rozenbloom, S., J. Fernandes, G. B. Gloor, and T. M. Wolever. 2014. "Evidence for greater production of colonic short-chain fatty acids in overweight than lean humans." *Int J Obes (Lond)* 38 (12):1525-31. doi: 10.1038/ijo.2014.46.
- Raman, M., I. Ahmed, P. M. Gillevet, C. S. Probert, N. M. Ratcliffe, S. Smith, R. Greenwood, et al. 2013. "Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with

- nonalcoholic fatty liver disease." *Clin Gastroenterol Hepatol* 11 (7):868-75.e1-3. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.015.
- Rau, M., A. Rehman, M. Dittrich, A. K. Groen, H. M. Hermanns, F. Seyfried, N. Beyersdorf, T. Dandekar, P. Rosenstiel, and A. Geier. 2018. "Fecal SCFAs and SCFA-producing bacteria in gut microbiome of human NAFLD as a putative link to systemic T-cell activation and advanced disease." *United European Gastroenterol J* 6 (10):1496-507. doi: 10.1177/2050640618804444.
- Razzaque, M. S. 2020. "Overconsumption of sugar-sweetened beverages: Why is it difficult to control?" *J Popul Ther Clin Pharmacol* 27 (2):e51-e7. doi: 10.15586/jptcp.v27i2.678.
- Rinninella, E., M. Cintoni, P. Raoul, L. R. Lopetuso, F. Scaldaferri, G. Pulcini, G. A. D. Miggiano, A. Gasbarrini, and M. C. Mele. 2019. "Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition." *Nutrients* 11 (10). doi: 10.3390/nu11102393.
- Rochlani, Y., N. V. Pothineni, S. Kovelamudi, and J. L. Mehta. 2017. "Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds." *Ther Adv Cardiovasc Dis* 11 (8):215-25. doi: 10.1177/1753944717711379.
- Saklayen, M. G. 2018. "The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome." *Curr Hypertens Rep* 20 (2):12. doi: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- Samuel, B. S., A. Shaito, T. Motoike, F. E. Rey, F. Backhed, J. K. Manchester, R. E. Hammer, et al. 2008. "Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (43):16767-72. doi: 10.1073/pnas.0808567105.
- Sánchez-Tapia, M., A. W. Miller, O. Granados-Portillo, A. R. Tovar, and N. Torres. 2020. "The development of metabolic endotoxemia is dependent on the type of sweetener and the presence of saturated fat in the diet." *Gut Microbes* 12 (1):1801301. doi: 10.1080/19490976.2020.1801301.
- Schiano, C., V. Grimaldi, M. Scognamiglio, D. Costa, A. Soricelli, G. F. Nicoletti, and C. Napoli. 2021. "Soft drinks and sweeteners intake: Possible contribution to the development of metabolic syndrome and cardiovascular diseases. Beneficial or detrimental action of alternative sweeteners?" *Food Res Int* 142:110220. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110220.
- Schwartz, A., D. Taras, K. Schäfer, S. Beijer, N. A. Bos, C. Donus, and P. D. Hardt. 2010. "Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects." *Obesity (Silver Spring)* 18 (1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167.
- Seregin, S. S., N. Golovchenko, B. Schaf, J. Chen, N. A. Pudlo, J. Mitchell, N. T. Baxter, et al. 2017. "NLRP6 Protects Il10(-/-) Mice from Colitis by Limiting Colonization of Akkermansia muciniphila." *Cell Rep* 19 (4):733-45. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.080.
- Shen, F., R. D. Zheng, X. Q. Sun, W. J. Ding, X. Y. Wang, and J. G. Fan. 2017. "Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 16 (4):375-81. doi: 10.1016/s1499-3872(17)60019-5.
- Simon, M. C., K. Strassburger, B. Nowotny, H. Kolb, P. Nowotny, V. Burkart, F. Zivehe, et al. 2015. "Intake of Lactobacillus reuteri improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: a proof of concept." *Diabetes Care* 38 (10):1827-34. doi: 10.2337/dc14-2690.
- Singh, R. K., H. W. Chang, D. Yan, K. M. Lee, D. Ucmak, K. Wong, M. Abrouk, et al. 2017. "Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health." *J Transl Med* 15 (1):73. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
- Singh, T. P., R. K. Malik, S. G. Katkamwar, and G. Kaur. 2015. "Hypocholesterolemic effects of Lactobacillus reuteri LR6 in rats fed on high-cholesterol diet." *Int J Food Sci Nutr* 66 (1):71-5. doi: 10.3109/09637486.2014.953450.
- Softic, S., J. G. Meyer, G. X. Wang, M. K. Gupta, T. M. Batista, Hpm Lauritzen, S. Fujisaka, et al. 2019. "Dietary Sugars Alter Hepatic Fatty Acid Oxidation via Transcriptional and Post-translational Modifications of Mitochondrial Proteins." *Cell Metab* 30 (4):735-53.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2019.09.003.
- Sousa, R. M. L., N. L. X. Ribeiro, B. A. S. Pinto, J. R. Sanches, M. U. da Silva, C. F. F. Coelho, L. M. Franca, J. A. de Figueiredo Neto, and A. M. A. Paes. 2018. "Long-term high-protein diet intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed adult rats." *Nutr Metab (Lond)* 15:53. doi: 10.1186/s12986-018-0290-y.

- Steensels, S., J. Qiao, Y. Zhang, K. M. Maner-Smith, N. Kika, C. D. Holman, K. E. Corey, W. C. Bracken, E. A. Ortlund, and B. A. Ersoy. 2020. "Acyl-Coenzyme A Thioesterase 9 Traffics Mitochondrial Short-Chain Fatty Acids Toward De Novo Lipogenesis and Glucose Production in the Liver." *Hepatology* 72 (3):857-72. doi: 10.1002/hep.31409.
- Tang, W. H. W., F. Bäckhed, U. Landmesser, and S. L. Hazen. 2019. "Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease: JACC State-of-the-Art Review." *J Am Coll Cardiol* 73 (16):2089-105. doi: 10.1016/j.jacc.2019.03.024.
- Tenorio-Jiménez, C., M. J. Martínez-Ramírez, I. Del Castillo-Codes, C. Arraiza-Irigoyen, M. Tercero-Lozano, J. Camacho, N. Chueca, et al. 2019. "Lactobacillus reuteri V3401 Reduces Inflammatory Biomarkers and Modifies the Gastrointestinal Microbiome in Adults with Metabolic Syndrome: The PROSIR Study." *Nutrients* 11 (8). doi: 10.3390/nu11081761.
- Tilg, H., P. D. Cani, and E. A. Mayer. 2016. "Gut microbiome and liver diseases." *Gut* 65 (12):2035-44. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312729.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. Hamady, C. M. Fraser-Liggett, R. Knight, and J. I. Gordon. 2007. "The human microbiome project." *Nature* 449 (7164):804-10. doi: 10.1038/nature06244.
- Whelan, F. J., C. P. Verschoor, J. C. Stearns, L. Rossi, K. Luinstra, M. Loeb, M. Smieja, J. Johnstone, M. G. Surette, and D. M. Bowdish. 2014. "The loss of topography in the microbial communities of the upper respiratory tract in the elderly." *Ann Am Thorac Soc* 11 (4):513-21. doi: 10.1513/AnnalsATS.201310-351OC.
- Yang, C., Q. Deng, J. Xu, X. Wang, C. Hu, H. Tang, and F. Huang. 2019. "Sinapic acid and resveratrol alleviate oxidative stress with modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed rats." *Food Res Int* 116:1202-11. doi: 10.1016/j.foodres.2018.10.003.

## CAPÍTULO III

### Artigo

**Extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* reverte hipetrigliceridemia e esteatose hepática de ratos alimentados com dieta rica em sacarose.**

#### **Autores e filiações:**

Perla Lopes de Freitas<sup>1</sup>, Marcus Vinicius Câmara Barros<sup>1</sup>, João Paulo Nascimento Miranda<sup>1</sup>, Rômulo Brênno Lopes Fróes<sup>1</sup>, Caio Fernando Ferreira Coêlho<sup>1</sup>, Katherine M. Kennedy<sup>2,3</sup>, Lucas Martins França<sup>1</sup>, Deborah M. Sloboda<sup>2</sup> e Antonio Marcus de Andrade Paes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio), Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, McMaster University, Hamilton, Canada.

<sup>3</sup>Farncombe Family Digestive Health Research Institute, McMaster University, Hamilton, Canada.

#### **\*Autor correspondente:**

Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio), Avenida dos Portugueses, 1966. Campus Dom Delgado, CEP: 65.080-805. São Luís (MA), Brasil.

E-mail: marcuspaes@ufma.br

## Resumo

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é a manifestação hepática da síndrome metabólica (SM). A sua alta prevalência está relacionada diretamente ao alto consumo de alimentos ricos em carboidratos simples e/ou gorduras. A resistência insulínica (RI) periférica se destaca como um dos principais mecanismos fisiopatológicos da DHGNA, uma vez que a RI induz uma maior liberação ácidos graxos livres (AGL) pelo tecido adiposo branco, o que estimula a lipogênese hepática e, conseqüentemente as dislipidemias. Produtos naturais ricos em polifenóis tem se destacado como alternativa terapêutica para o tratamento dessas desordens metabólicas, inclusive devido ao seu potencial como modulador da microbiota intestinal. Nesse contexto, destaca-se a espécie vegetal *Syzygium cumini*, que apresenta alto teor de polifenóis. Em estudos do nosso grupo, foram observados resultados expressivos do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* (EH) sobre o metabolismo energético de animais com obesidade e DM induzidos pelo L-glutamato monossódico (MSG). No entanto, há a ausência de trabalhos que avaliem o efeito desse extrato sobre modelos experimentais de SM que mais se assemelham aos humanos, que são os induzidos por dietas. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito do EH sobre o metabolismo glico-lipídico e a microbiota intestinal de ratos alimentados com dieta rica em sacarose. Ratos Wistar foram alimentados com dietas padrão (CTR) ou rica em sacarose (HSD) por 17 semanas. Após esse período, os animais HSD foram divididos em 3 grupos: HSD tratado (v.o) com EH nas doses de 0,25 g/Kg (HSD+EH 0,25; n=7) ou 0,5 g/Kg (HSD+EH 0,50; n=7), e HSD (n=8) que recebeu apenas H<sub>2</sub>O (0,1 ml/kg). O tratamento foi realizado por 5 semanas. O peso corporal, consumo alimentar e índice de Lee (IL) foram avaliados durante o tratamento. Ao fim do tratamento, testes de tolerância a glicose (GTT) e insulina (ITT) foram realizados. O sangue foi coletado durante a eutanásia para determinação dos níveis séricos de glicose (GL), triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT). A RI foi avaliada pelo cálculo dos índices HOMA1-IR e TyG. Para avaliação da DHGNA, a análise histológica do fígado foi feita através da coloração Oil Red O. Outras amostras de fígado foram coletadas para análise do conteúdo de glicogênio e da expressão proteica da AKT e GRP78. As amostras de fezes coletadas foram imediatamente armazenadas a -80 °C e, posteriormente, utilizadas para extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. O EH, nas duas doses, reduziu a GL em jejum do grupo HSD em torno de 20 (0,25) e 16 % (0,5), quando comparados aos animais HSD sem tratamento. Esse efeito foi corroborado com reduções de quase 7% (nas duas doses) do TyG, redução em torno de 56% do HOMA1-IR na dose de 0,5, redução dos níveis séricos de insulina em ambas as doses (35% e 58%, respectivamente) e atenuações das intolerâncias à GL e insulina nos animais tratados com EH. Sobre os lipídeos séricos, o extrato foi capaz de diminuir em torno de 40% os TG, nas duas doses avaliadas. Efeito corroborado com a reversão da DHGNA nos animais HSD que receberam o EH. No fígado, também houve aumentos do glicogênio hepático e das expressões proteicas da AKT e GRP78, principalmente nos animais HSD+EH0,5. Porém, o EH não foi capaz de modular a microbiota intestinal que foi totalmente modificada pela dieta rica em sacarose. Com esses resultados, confirma-se o uso tradicional dessa planta no controle da homeostase glicêmica. Além disso, demonstra-se, pela primeira vez, a capacidade do EH na reversão da hipertrigliceridemia e esteatose hepática em um modelo de SM semelhante a humana. Efeitos que podem estar relacionados as melhoras da sensibilidade insulínica e do estresse do retículo endoplasmático nesse órgão, principalmente através do aumento da GRP78. Entretanto, o mecanismo pelo qual o EH melhora esses parâmetros metabólicos não devem envolver a modulação da microbiota intestinal. Com isso, este estudo contribui para validação do uso das folhas de *S. cumini* como potencial fitoterápico para tratamento de desordens do metabolismo glico-lipídico.

**Palavras-chave:** *Syzygium cumini*, DHGNA, hipertrigliceridemia, dieta rica em sacarose.

## INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é decorrente do acúmulo de triglicerídeos (TG) nos hepatócitos, resultante de um desequilíbrio entre o influxo de lipídios e os mecanismos de remoção, na ausência de infecções e ingestão de álcool. A prevalência mundial da DHGNA varia entre 8 e 45%. Na América do Norte e Europa a variação está entre 25 a 34%, sendo mais prevalente no Oriente Médio e na América do Sul (Friedman et al. 2018). Acredita-se que uma vez instalada a esteatose, o fígado pode ficar mais suscetível a outras condições nocivas, como o estresse oxidativo, endotoxinas provenientes do intestino ou citocinas pró-inflamatórias (Byrne et al. 2009; Rafiei, Omidian, and Bandy 2019). A DHGNA também é reconhecida como uma das doenças que caracterizam o quadro de síndrome metabólica, em associação com a resistência insulínica, obesidade, dislipidemias e diabetes (Abenavoli et al. 2017). De acordo com estimativas associadas a prevalência global do diabetes (8,8%), acredita-se que a prevalência mundial de síndrome metabólica seja três vezes maior, ou seja, estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo sejam afetadas por essa síndrome (Saklayen 2018).

O metabolismo lipídico hepático é regulado pela interação de diferentes fatores de transcrição e receptores nucleares, como também por genes envolvidos na lipogênese e na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Qualquer interferência na delicada regulação dessas vias pode ocasionar a DHGNA (Bechmann et al. 2012; Rafiei, Omidian, and Bandy 2019). O acúmulo de TG no tecido adiposo branco (TAB) contribui para o surgimento de inflamação crônica local e, conseqüente, aumento de citocinas pró-inflamatórias. A presença dessas citocinas associadas ao estresse oxidativo, interfere na sinalização insulínica no TAB resultando em um quadro de resistência insulínica (RI) (Heymsfield and Wadden 2017b). Como conseqüências da RI tem-se a maior liberação de ácidos graxos livres (AGL) pelo TAB e estímulo da lipogênese no fígado, o que favorece o aparecimento das dislipidemias (Taskinen and Borén 2015). Dietas

ricas em gorduras saturadas, carboidratos refinados e bebidas ricas em açúcares de adição são fatores contribuintes para a patogênese da DHGNA (Moore 2019). Estudo recente do nosso grupo demonstrou que o consumo da dieta rica em sacarose (HSD) por um período de 60 dias promoveu esteatose hepática microvesicular em camundongos (Flister et al. 2018). Resultado semelhante foi observado em estudo com ratos alimentados com a HSD por 20 semanas (Sousa et al. 2018).

A disfunção do adipócito estimula o fígado a sintetizar mais TG, tanto pela maior captação de AGL da circulação, como pela síntese *de novo* de lipídeos em consequência da hiperinsulinemia provocada pela RI. Como resultado do maior acúmulo de gordura hepática, o fígado exportará maiores quantidades de TG na forma de VLDL, contribuindo, dessa forma, tanto para o desenvolvimento da DHGNA como da hipertrigliceridemia (Eslamparast, Tandon, and Raman 2017). Essas desordens do metabolismo lipídico associadas são fatores de risco direto para as doenças cardiovasculares, que são as principais causas de morte no mundo ("Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013" 2015). Dessa forma, a prevenção e o tratamento destas desordens, principalmente em indivíduos com obesidade e síndrome metabólica, são de extrema necessidade (Perdomo, Fruhbeck, and Escalada 2019).

Nos últimos anos vem sendo estudado a interação entre as doenças do fígado e a microbiota intestinal. Essa interação, chamada de eixo intestino-fígado, envolve metabólitos específicos, como ácidos biliares (AB), lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O metabolismo de lipídios e carboidratos envolve diferentes tipos de bactérias e está associado a obesidade. Por esta razão, a microbiota intestinal e seus metabólitos podem regular muitas desordens relacionadas ao metabolismo energético, como a hiperlipidemia, arterosclerose, diabetes e inflamação (Rinaldi et al. 2021). Como alternativa terapêutica para o

tratamento dessas patologias, alimentos ricos em polifenóis e antioxidantes se mostram promissores em muitos estudos (Ulla et al. 2017).

A biodisponibilidade dos polifenóis e seus produtos depende da ação de bactérias intestinais, pois estas são capazes de modificar a estrutura química dos polifenóis, convertendo-os em metabólitos de baixo peso molecular e, portanto, de melhor absorção (Ozidal et al. 2016). Sabe-se, por exemplo, que bactérias do filo Firmicutes apresentam menos enzimas de degradação de glicanos do que Bacteroidetes. Dessa forma, a metabolização dos polifenóis varia de acordo com sua estrutura química e o filo bacteriano presente no momento da interação (Mahowald et al. 2009). Assim, essa interação entre a microbiota intestinal e os polifenóis produz diferentes compostos que podem modular a composição desta microbiota, principalmente pela inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Além disso, os polifenóis e os produtos dessa interação também atuam como prebióticos, favorecendo assim, o crescimento de bactérias benéficas (Fandriks 2017).

*Syzygium cumini* (L.) Skeels (sinonímia: *Syzygium jambolanum* D.C., *Eugenia jambolana* Lam.) é uma Myrtaceae originária da Ásia tropical e cultivada em vários países, inclusive no Brasil, onde é conhecida popularmente como jambolão, jamelão entre outros nomes. Vários compostos polifenólicos e antioxidantes como, flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e terpenos se encontram presentes em diferentes partes desta planta (Chagas et al. 2015). Estudos farmacológicos têm demonstrado várias atividades biológicas do *S. cumini* como: anti-hiperglicemiante (Kumar et al. 2013), cardioprotetor (Mastan et al. 2009) e antioxidante (Arun et al. 2011b; Sanches et al. 2016). Em 2009 o Ministério da Saúde a incluiu na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), reconhecendo o seu importante papel no contexto etnofarmacológico brasileiro (BRASIL 2009).

O nosso grupo identificou a presença de vários polifenóis no extrato hidroalcoólico (HE) das folhas de *S. cumini*, destacando-se miricetina e seu derivados e galotaninos, o que



demonstra uma promissora ação antioxidante do EH (Sanches et al. 2016). Tanto nesse estudo, como em dois outros anteriores, foi comprovado que o tratamento com EH melhorou a ação periférica da insulina restabelecendo parâmetros insulino-glicolipídicos em ratos obesos MSG (Franca et al. 2019; Sanches et al. 2016) e com diabetes induzida por aloxana (Chagas et al. 2018). Entretanto, não há estudos que avaliem o efeito desse EH sobre modelos de SM mais semelhante à humana, como a induzida por dietas enriquecidas por carboidratos simples. Portanto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito do EH sobre o metabolismo glicolipídico e a microbiota intestinal de animais alimentados com dieta rica em sacarose.

## **METODOLOGIA**

### *Material Botânico e Obtenção do Extrato Hidroalcoólico de *S. cumini**

As folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels foram coletadas no Campus do Bacanga da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), na cidade de São Luís, estado do Maranhão, Brasil. Uma exsicata da espécie vegetal foi registrada sob o número 4574 no Herbário “MAR – Herbário do Maranhão”.

Após a coleta, ocorreu a secagem (40°C) e pulverização das folhas. O pó obtido foi macerado em solução hidroalcoólica (etanol 70%), na proporção de 1:6 (p/v), durante 3 dias com agitação constante e renovação do solvente a cada 24 hs dias. O material extraído filtrado e concentrado (45°C) foi denominado extrato hidroalcoólico de *Syzygium cumini* (EH), o qual passou por liofilização, obtendo-se o EH em pó, que foi ressuscitado em água destilada, no momento do uso, para realização dos ensaios experimentais *in vivo*.

### *Dieta rica em sacarose*

A ração rica em sacarose foi manufaturada a partir de modificações na metodologia proposta por Lima e cols. (2008) e planejada para possuir valores energéticos semelhantes à

ração padrão (isocalórica). Para isso, a ração padrão (Nuvital®, Nuvilab, Brasil) pulverizada (40%) foi misturada ao leite condensado (Moça® - Nestle) (40%), açúcar refinado (8,5%) e água até formar uma massa pastosa, apresentando uma composição final de macronutrientes demonstradas na tabela 1. Esta mistura foi manipulada para formar *pellets* semelhantes à ração padrão e dessecada em estufa (38 °C por 3 dias). Posteriormente, a ração produzida foi armazenada em geladeira por no máximo 10 dias.

**Tabela 1. Composição centesimal da dieta padrão e da dieta rica em sacarose**

<b>Composição centesimal</b>	<b>Dieta padrão</b>	<b>Dieta rica em sacarose</b>
Carboidratos	55,4%	65%
<i>Sacarose</i>	10%	25%
Proteínas	21%	12,3%
Lipídeos	5,2%	4,3%
<b>Valor energético</b>	<b>352Kcal/100g</b>	<b>348Kcal/100g</b>

#### *Indução da Obesidade e Tratamento Crônico com o EH*

Logo após o desmame (21 dias de vida), ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* var. Wistar foram randomizados em 2 grupos: o primeiro alimentado com a ração padrão denominado grupo controle (CTR; n=6); o segundo alimentado com a dieta rica em sacarose (HSD; n=22) por um período de 17 semanas. Após esse período, os animais HSD foram randomizados em 3 novos grupos: animais mantidos com a dieta rica em sacarose (HSD; n=8) e animais mantidos com a dieta rica em sacarose e tratados (v.o) com extrato hidroalcoólico (EH) de *S. cumini* nas doses de 0,25 g/Kg (HSD + EH 0,25; n=7) ou 0,5 g/Kg (HSD +EH 0,50;

n=7) por um período de 5 semanas. Os animais CTR e HSD receberam H<sub>2</sub>O (0,1 ml/kg; v.o) pelo mesmo período. O desenvolvimento da obesidade foi avaliado, antes, durante e após o tratamento, pelo cálculo do Índice de Lee [(peso corporal (g)<sup>1/3</sup>/comprimento naso-anal (cm) x 1000] (Bernardis and Patterson 1968). Durante todo o período de tratamento o consumo de ração e a avaliação do desenvolvimento ponderal foram realizados três vezes por semana.

Todos os procedimentos realizados com animais estavam de acordo com o Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-UFMA), os quais foram submetidos para análise e aprovados pelo CEUA-UFMA sob o número de processo 23115.016318/2016-96.

#### *Testes de tolerância a glicose (GTT) e insulina (ITT) e índice TyG*

Na semana anterior da eutanásia foram realizados os testes tolerância à glicose (GTT) e insulina (ITT). Para o GTT, após um jejum de 8 horas foi mensurada a glicemia dos animais pela cauda (glicosímetro Accucheck Active<sup>®</sup>) nos tempos 0 (basal) e 15, 30, 60, 120 min após um bolus de glicose (2 g/Kg; v.o.) O ITT foi realizado de forma semelhante, no entanto a glicemia do tempo zero foi realizado em estado pós-prandial e as outras após 15, 30, 45 e 60 min após de uma dose de insulina (1 UI/g de peso; i.p.) (Rafacho et al. 2007). Para avaliação da resistência à insulina o índice TyG foi calculado a partir dos resultados da glicemia de jejum e níveis séricos de triglicerídeos (Guerrero-Romero et al. 2010).

#### *Avaliações Séricas*

Antes, durante e ao final do tratamento, os animais foram submetidos a uma restrição alimentar de 10 a 12 horas para coleta de sangue da cauda. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 5 min para obtenção do soro, o qual foi utilizado para a determinação das concentrações de triglicerídeos e colesterol total, por métodos

espectrofotométricos utilizando *kits* laboratoriais. A glicemia foi avaliada pela cauda por meio de tiras e glicosímetro (Accucheck Active®).

#### *Coleta e análise morfológica*

No período determinado (05 meses), os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal) e foram realizadas coletas de sangue via artéria mesentérica. Em seguida, eles foram decapitados para a realização da tricotomia da região dorsolateral da cabeça até a exposição da sutura lambdóide da calota craniana. A seguir, foram craniotomizados para retirada do cérebro e isolamento do núcleo do trato solitário (NTS). Por fim, foram laparotomizados para a retirada dos coxins adiposos (gordura periepídídima, retroperitoneal, mesentérico e marrom), fígado, pâncreas e músculos sóleo e gastrocnêmio que foram lavados com solução salina, dessecados e pesados (Moon et al. 2013). Todas as amostras foram conservadas e armazenadas (-80 C) para futuras análises de expressão gênica e proteica. As carcaças dos animais sacrificados foram prontamente identificadas e refrigeradas (-20°C) sendo encaminhadas, no dia seguinte, ao Biotério Central da UFMA para o correto descarte.

#### *Histologia e glicogênio hepático*

As amostras de fígado foram incluídas no composto Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, EUA) e congeladas rapidamente em uma mistura de gelo seco e 2-metilpentano (Fisher Scientific, EUA). Cortes de fígado com 10 µm de espessura foram fixados em formol a 10% e corados com Oil Red O (Sigma-Aldrich, EUA). Essas seções foram analisadas por dois pesquisadores de uma maneira cega independente para determinar o escore NAFLD / NASH para o grau de esteato-hepatite, de acordo com os critérios definidos previamente (Kleiner et al. 2005). As lâminas foram digitalizadas usando um microscópio Olympus BX53 (Olympus

America, EUA), e as imagens digitais de alta resolução foram capturadas em um computador com ampliações de alta potência (X4 ou X20).

Para determinação do glicogênio hepático foi realizado o protocolo Hassid and Abraham (1957) com algumas modificações. Amostras (250 mg) de fígado foram colocadas em tubos contendo 1 ml de KOH 30% e fervidas (100 °C) por 1 h para completa homogeneização. Em seguida, em cada tubo foi adicionado 100 µl de NaSO<sub>4</sub> 50% e 3,5 ml de etanol (70%) e, então, fervido (100 °C, 15 min) para precipitação do glicogênio. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm (20 min) e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuscitado em água quente. Em 5 µl dessa ressuspensão foi adicionado 445 µl de H<sub>2</sub>Odd e 1 ml da antrona 0,2% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Essa mistura foi aquecida (100 °C, 15 min) e o conteúdo de glicogênio mensurado por espectrofotometria (650 nm).

#### *Expressão proteica por western blotting*

Amostras de fígado foram homogeneizadas com tampão de lise contendo inibidores de proteases (1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina e 10 mM PMSF) e fosfatases (2 mM ortovanato de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio e 10 mM β-glicerolfosfato). 30 µg de proteína de cada amostra foi diluída com tampão de amostra Laemmli e carregado em gel SDS-PAGE para separação proteica. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Para detecção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos primários: anti-Akt (Cell Signaling, USA, Cat. #9272) e anti-GRP78 (Enzo Life Sciences, USA, Cat. #ADI-SPA-827). Em seguida, foi realizada a incubação por 1 h (temperatura ambiente) com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase. A revelação das proteínas foi feita por quimioluminescência utilizando kit SuperSignal<sup>TM</sup> (Thermo Scientific, USA, Cat. #34577).

### *Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA para avaliação da microbiota intestinal*

Ao final do tratamento com o EH, amostras de fezes foram coletadas e imediatamente estocadas em freezer a -80 °C e, subsequentemente, usadas para a extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento do gene bacteriano 16S rRNA. O DNA genômico foi extraído e a amplificação da região V3 do gene 16S rRNA foi realizada conforme descrito anteriormente (Bartram et al. 2011; Whelan et al. 2014). Resumidamente, cada pellet fecal foi homogeneizado mecanicamente e lisado enzimaticamente antes da extração de DNA com fenol-clorofórmio-isoamil. A amplificação da região V3V4 foi realizada usando primers reversos adaptados a um barcode. Cada reação continha 5 pmol de primer, 200 mM de dNTPs, 1,5ul 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de 10 mg / ml de soro albumina bovina (irradiado com um transiluminador para eliminar DNA contaminante) e 0,25ul de Taq polimerase (Life Technologies, Canadá) para um volume total de reação de 50 µl. Os produtos de PCR foram purificados por eletroforese em gel e subsequentemente sequenciado usando a plataforma Illumina MiSeq (2x150bp) no Farncombe Genomics Facility (McMaster University, Hamilton ON, Canadá).

### *Análise do sequenciamento do gene 16S rRNA*

Os arquivos FASTQ resultantes foram processados usando um pipeline interno personalizado (Whelan et al. 2014). Os reads que excederam o comprimento da região 16S rRNA V3 foram cortadas usando Cutadapt (Martin 2011), e os reads emparelhados foram alinhadas usando PANDASeq (Masella et al. 2012). Amplicons de sequências variantes (ASVs) foram geradas usando DADA2 (Callahan et al. 2016a) e taxonomia foi atribuída usando o RDP Classifier (Ribosomal Database Project, RRID: SCR\_006633) contra o banco de dados de referência Silva 132. ASVs não bacterianos foram removidos por taxa de exclusão pertencentes ao reino Eukaryota, um filo desconhecido, ou a família Mitocôndria.

A análise dos dados de sequenciamento foi realizada em R (Projeto R para Computação Estatística, RRID: SCR\_001905). Medidas de alfa diversidade dos dados ASV rarefeitos foram calculadas usando o índice de diversidade de Shannon (phyloseq, RRID: SCR\_013080) e analisadas por modelo linear misto com tratamento (HFCS vs controle) e dia (3 semanas vs 6 semanas) como efeitos fixos e ID de camundongo como um efeito aleatório. A beta diversidade de contagens de ASV normalizadas (soma total escalonada) foi calculada usando a métrica de dissimilaridade Bray Curtis e visualizada através da ordenação da Análise das Principais Coordenadas (PCoA) (ggplot2, RRID: SCR\_014601). As diferenças de toda a comunidade entre os grupos foram analisadas usando análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) e o comando adonis (vegan; RRID: SCR\_011950). DESeq2 (RRID: SCR\_015687) foi usado para identificar gêneros que diferiam significativamente entre os grupos (limite de significância definido como um valor  $p < 0,01$  após o ajuste para testes múltiplos via implementação DESeq2 do procedimento de ajuste de testes múltiplos de Benjamini-Hochberg) e visualizado usando ggplot2.

#### *Análise estatística dos resultados*

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias. A análise dos dados dos experimentos foi realizada por meio dos testes estatísticos paramétricos (teste t de Student não pareado e unicaudal e análise de variância – ANOVA pós-teste Newman Keuls). As diferenças foram significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### *Evolução ponderal e consumo energético dos animais ao final do tratamento com o EH*

Os animais HSD tratados com o EH na dose de 0,5g/Kg apresentaram uma redução de peso significativa a partir da segunda semana tratamento em relação aos grupos CTR (CTR vs. HSD + EH 0,50 =  $442 \pm 13,2\text{g}$  vs.  $389 \pm 16,5\text{ g}$ ) e HSD (HSD vs. HSD + EH 0,50 =  $449 \pm 6,8\text{g}$  vs.  $389 \pm 16,5\text{g}$ ), sendo mantida esta diferença até a última semana de tratamento (CTR vs. HSD + EH 0,50 =  $451 \pm 15,8\text{g}$  vs.  $398 \pm 18,2\text{g}$ ; HSD vs. HSD + EH 0,50 =  $463 \pm 8,7\text{g}$  vs.  $398 \pm 18,2\text{g}$ ). Durante o período de tratamento com o EH, os grupos tratados apresentaram uma redução no consumo energético a partir da segunda semana em relação aos grupos CTR (CTR vs. HSD + EH 0,25 =  $19,74 \pm 1,07$  vs.  $12,10 \pm 1,64$ ; CTR vs. HSD + EH 0,50 =  $19,74 \pm 1,07$  vs.  $10,54 \pm 1,01$ ) e HSD (HSD vs. HSD + EH 0,25 =  $16,12 \pm 0,83$  vs.  $12,10 \pm 1,64$ ; HSD vs. EH 0,50 =  $16,12 \pm 0,83$  vs.  $10,54 \pm 1,01$ ). No entanto, ao final do tratamento essa redução do consumo energético nos grupos tratados permaneceu diferente apenas em relação ao grupo CTR (CTR vs. HSD + EH 0,25 =  $18,60 \pm 1,23$  vs.  $15,04 \pm 1,66$ ; CTR vs. HSD + EH 0,50 =  $18,60 \pm 1,23$  vs.  $14,49 \pm 2,49$ ). Com relação ao Índice de Lee durante o período de tratamento com o EH, o grupo HSD + EH 0,50 apresentou valores menores quando comparados aos grupos CTR (HSD+ EH 0,50 vs. CTR =  $300,9 \pm 3,33$  vs.  $307,9 \pm 4,34\text{g}^{1/3}/\text{cm}^{-1}$ ), HSD (HSD+ EH 0,50 vs. HSD =  $300,9 \pm 3,33$  vs.  $307,7 \pm 2,35\text{ g}^{1/3}/\text{cm}^{-1}$ ) e HSD + EH 0,25 (HSD+ EH 0,50 vs. HSD + EH 0,25 =  $300,9 \pm 3,33$  vs.  $308,0 \pm 6,25\text{ g}^{1/3}/\text{cm}^{-1}$ ) (Figura 1).



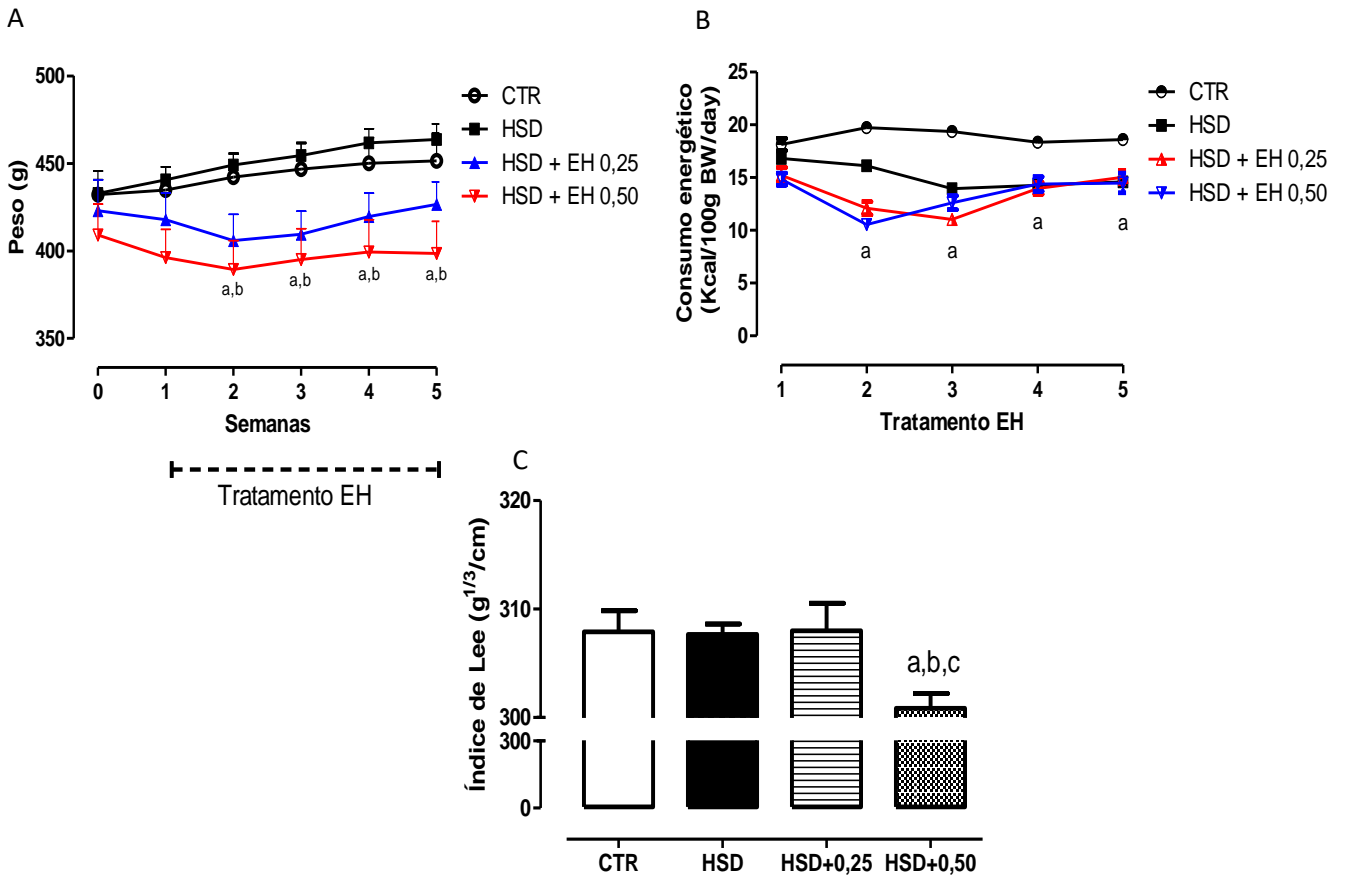


Figura 1. Parâmetros morfométricos durante o tratamento com o EH. A. Peso dos animais em gramas (g) durante o período de 5 semanas de tratamento com o EH. B. Consumo energético dos animais durante o tratamento com o EH. C. Índice de Lee (IL) ( $g^{1/3}/cm^{-1}$ ). One-way ANOVA (Newman Keuls). <sup>a</sup> (HSD + EH 0,50 vs CTR). <sup>b</sup> (HSD + EH 0,50 vs HSD). <sup>c</sup> (HSD + EH 0,50 vs HSD + EH 0,25).

### *O tratamento com o EH melhora o metabolismo glico-lipídico dos animais HSD*

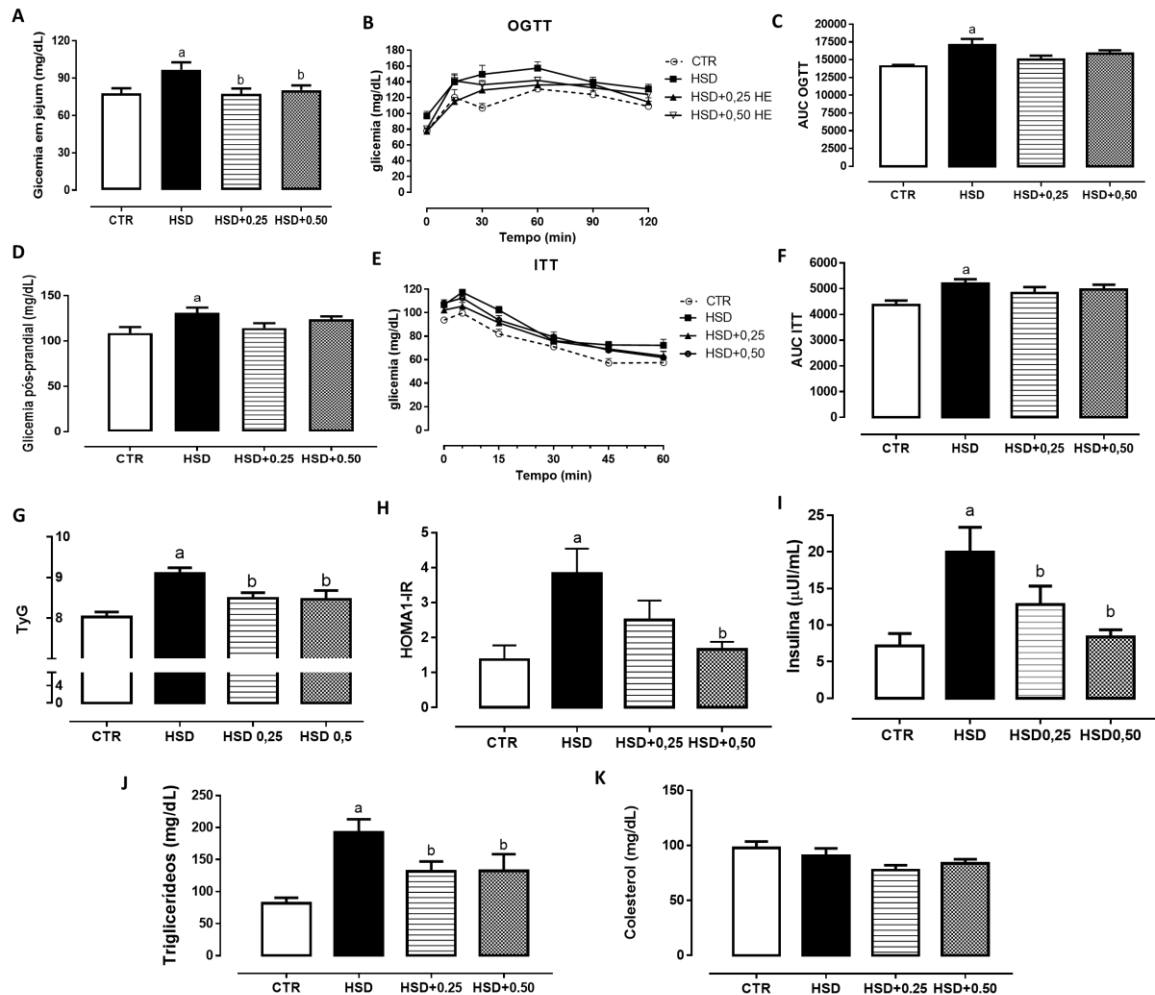
Ao final do período de tratamento com o EH foram observadas diferenças significativas quanto aos níveis de glicemia de jejum entre os grupos CTR e HSD (CTR vs. HSD =  $77,83 \pm 4,02$  vs.  $96,88 \pm 5,83$  mg/dL), como também foram observadas diferenças entre os grupos tratados com o EH em relação ao grupo HSD (HSD vs. HSD + EH 0,25 =  $96,88 \pm 5,83$  vs.  $77,43 \pm 4,30$  mg/dL; HSD vs. HSD + EH 0,50 =  $96,88 \pm 5,83$  vs.  $80,43 \pm 3,69$  mg/dL) (Fig. 2 A) Os níveis glicêmicos pós-prandiais foram significativamente mais elevados nos animais

HSD em comparação ao grupo CTR (CTR vs. HSD =  $109 \pm 6,53$  vs.  $131,1 \pm 5,95$  mg/dL) (Fig. 2 D).

Com relação à avaliação da intolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, ao final do tratamento com o EH nas duas doses avaliadas, a análise da área sob a curva, tanto do GTT ( $p=0,0133$ ) (Fig. 2 B e C) quanto do ITT ( $p=0,0440$ ) (Fig. E e F) mostraram uma diferença entre os grupos CTR e HSD, como também a capacidade do EH em atenuar as intolerâncias a glicose e a insulina dos animais HSD tratados. O índice TyG nos animais do grupo HSD ( $9,09 \pm 0,14$ ) foi maior em comparação aos animais do grupo CTR ( $8,03 \pm 0,11$ ). Entretanto, nos animais dos grupos tratados com o EH (HSD + EH 0,25 =  $8,48 \pm 0,13$ ; HSD + EH 0,50 =  $8,46 \pm 0,21$ ) esse índice foi menor em comparação aos animais do grupo HSD ( $9,09 \pm 0,14$ ) (Fig. 2 G). Esse resultado é corroborado pelo dado do índice HOMA1-IR, que mostra que os animais HSD tratados com o EH na dose de 0,5g/Kg ( $1,64 \pm 0,21$ ) tiveram a sua sensibilidade periférica a insulina restabelecida a níveis bem semelhantes ao dos animais do grupo controle ( $1,36 \pm 0,40$ ) (Fig. 2 H). Além disso, o EH também foi capaz de reduzir os níveis séricos de insulina dos animais HSD tratados em ambas as doses (~35% no grupo HSD + 0,25 e ~58% no grupo HSD + 0,50) (Fig.2 I).

Os níveis séricos de colesterol não foram diferentes entre os grupos, permanecendo inalterado até o final do tratamento (Fig. 2 J). No entanto, observamos aumento dos níveis séricos de TG a partir de 90 dias de indução da obesidade em animais alimentados com a dieta rica em sacarose (CTR vs. HSD =  $117,4 \pm 13,22$  vs.  $248,3 \pm 14,21$  mg/dL), sendo que essas diferenças permaneceram até o final do período de indução (CTR vs. HSD =  $81,80 \pm 8,60$  vs.  $192,1 \pm 20,86$  mg/dL). Ao final do tratamento, os animais que receberam o EH apresentaram níveis séricos de triglicerídeos reduzidos em comparação aos animais do grupo HSD (HSD vs.

HSD + EH 0,25 =  $200,7 \pm 21,99$  vs.  $118,1 \pm 9,25$  mg/dL; HSD vs. HSD + EH 0,50 =  $200,7 \pm 21,99$  vs.  $108,9 \pm 13,47$  mg/dL) (Fig. 2 K).

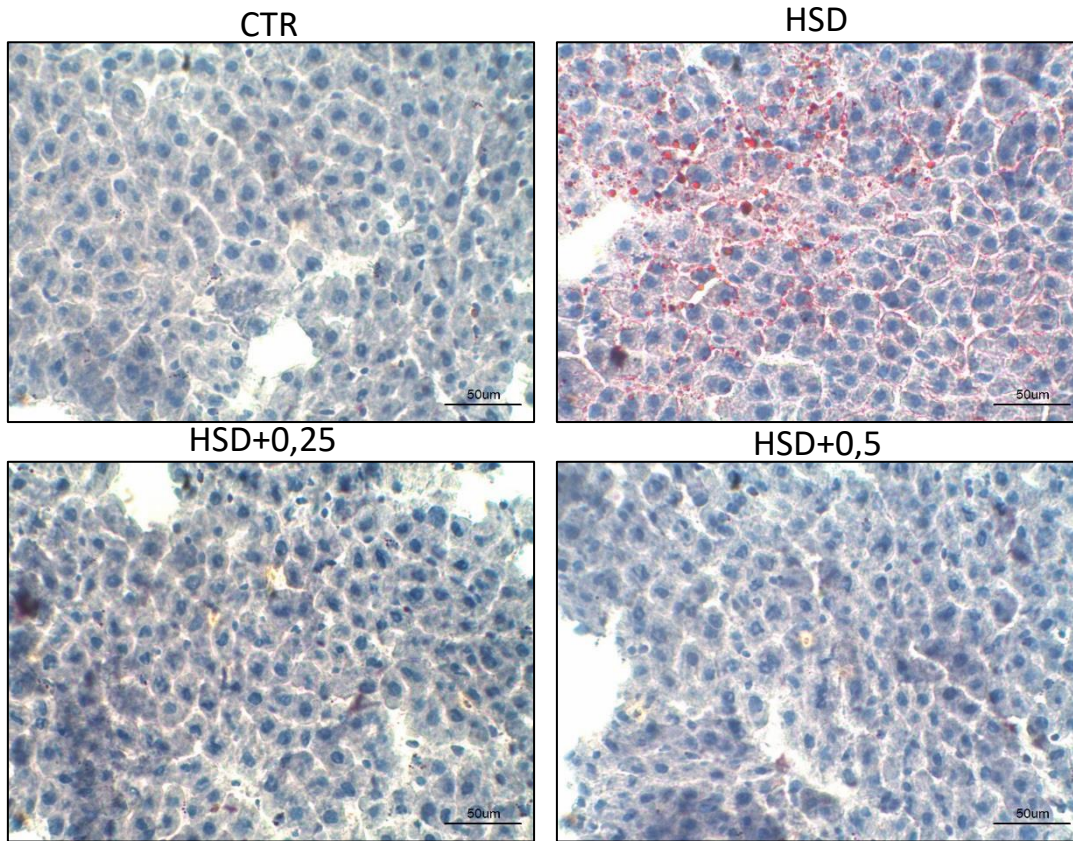


**Figura 2.** Avaliação da resistência insulínica e perfil bioquímico. A. Níveis glicêmicos pré-prandiais durante o período de tratamento com o EH. B. Níveis de glicose no sangue durante o teste de tolerância a glicose (GTT). C. Área sob a curva (AUC) dos níveis de glicose no sangue durante o GTT. D. Níveis glicêmicos pós-prandiais durante o período de tratamento com o EH. E. Níveis de glicose no sangue durante o teste de tolerância a insulina (ITT). F. Área sob a curva (AUC) dos níveis de glicose no sangue durante o ITT. G. Índice TyG. H. HOMA1-IR. I. Níveis de insulina em jejum. J. Níveis séricos de triglicerídeos. K. Níveis séricos de colesterol avaliados em ratos CTR, HSD e tratados com o EH após o período de 5 semanas. Os valores representam média  $\pm$  epm. One-way ANOVA (Newman Keuls). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  comparado ao CTR, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparado ao HSD.

#### *O tratamento com o EH reverte a esteatose hepática nos animais HSD*

A análise microscópica das amostras de fígado mostrou a presença de esteatose hepática nos animais HSD em comparação com os animais do grupo CTR. Não foi observado a presença

de *ballooning* ou inflamação. Entretanto, nos dois grupos de animais tratados com o EH, o acúmulo de lipídios nos hepatócitos foi reduzido em comparação do grupo HSD, não sendo, portanto, caracterizada a presença de esteatose hepática (Figura 3).

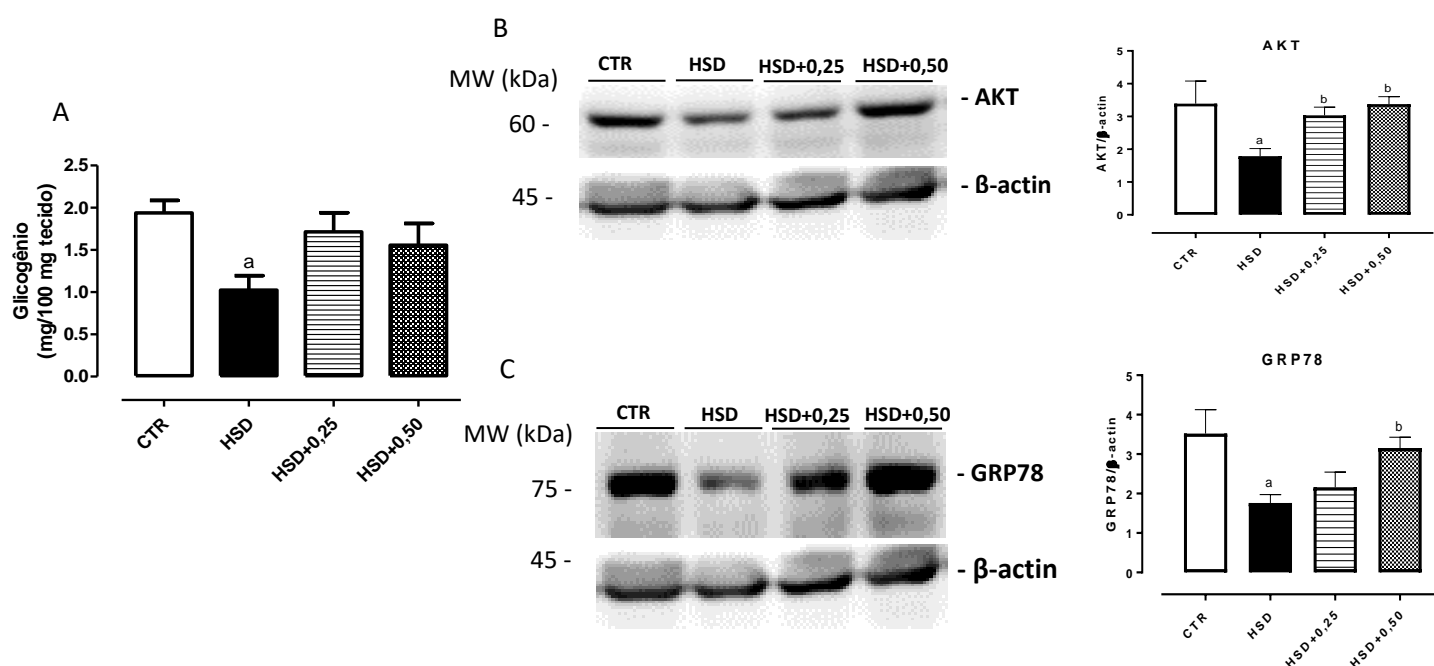


NAFLD escore	CTR	HSD	HSD+0,25	HSD+0,5
Esteatose	0,0 ± 0,00	1,0 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,16 <sup>b</sup>
Inflamação	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
<i>Ballooning</i>	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Total	0,0 ± 0,00	1,0 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,16 <sup>b</sup>

Figura 3. Análise histológica do fígado após o tratamento com o EH. Secções de amostras de fígado coradas com Oil Red para a visualização de *droplets* de lipídios, morfologia de hepatócitos, score para esteatose, ballooning e inflamação avaliados em ratos do grupo CTR (n=6), HSD (n=8), HSD+0,25EH (n=7) e HSD+0,50EH (n=7). Os valores representam média ± epm. One-way ANOVA (Newman Keuls). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  comparado ao CTR, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparado ao HSD.

*O tratamento com o EH melhora o conteúdo hepático de glicogênio e promove o aumento da expressão proteica da AKT e GRP78 no fígado*

O conteúdo de glicogênio hepático é um importante preditor de resistência insulínica no fígado, ou seja, em um processo de resistência insulina hepática a biossíntese de glicogênio é reduzida. Foi observado que o conteúdo de glicogênio hepático dos animais HSD foi reduzido em comparação aos animais do grupo CTR. Em contrapartida, os animais tratados com o EH apresentaram um aumento do conteúdo de glicogênio hepático em comparação com os animais do grupo HSD (Figura 4A). Para investigar a via de sinalização insulínica no fígado, avaliamos a expressão da proteína AKT, pois esta participa da cascata de sinalização insulínica que promove a translocação de transportadores GLUT 4 para a membrana da célula e, assim, a captação de glicose em tecidos periféricos. Foi observado que nos animais HSD a expressão da Akt foi reduzida em 47,19 % quando comparado aos animais do grupo CTR. O tratamento com o EH nas duas doses, aumentou a expressão da AKT nos animais HSD em 69,27 % e 88,26 %, respectivamente (Figura 4B). A correta sinalização insulínica hepática contribui também para a homeostase do retículo endoplasmático (RE), pois já está bem evidenciado a associação entre o estresse do RE e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). Dessa forma, avaliamos a expressão da chaperona GRP78, uma das proteínas mais bem caracterizadas e associadas a manutenção da homeostasia do RE. Os animais HSD apresentaram uma redução da GRP78 em 50% quando comparado aos animais do grupo CTR. O tratamento com o EH na dose de 0,50g/Kg aumentou a expressão da GRP78 nos animais HSD em 78,97% (Figura 4C).



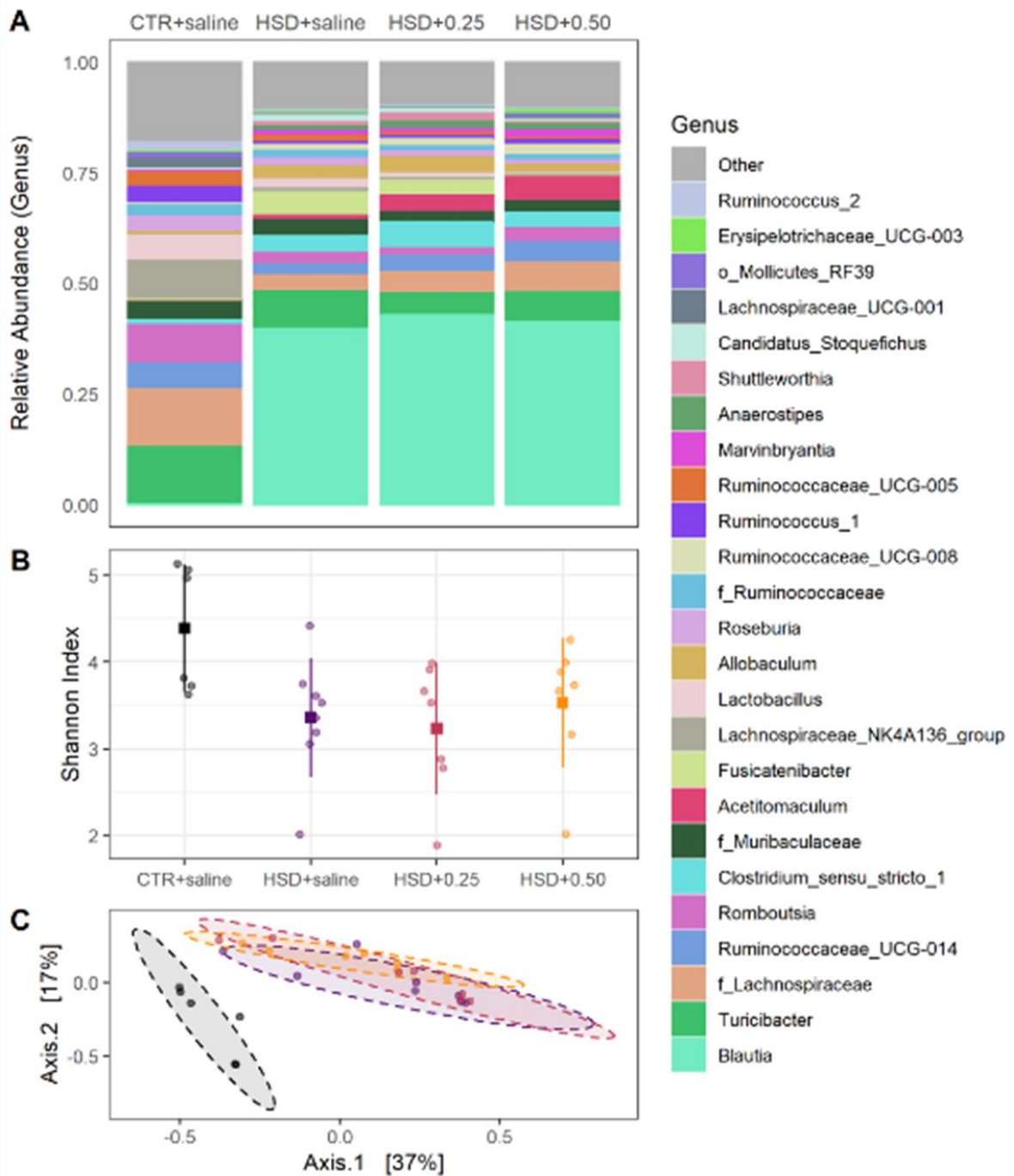
**Figura 4.** Avaliação de marcadores da sinalização insulínica hepática e do estresse do retículo endoplasmático. **A.** Nível de glicogênio hepático dos animais dos grupos controle (CTR), alimentados com dieta rica em sacarose (HSD) e tratados com o EH (HSD+0,25; HSD+0,50). **B.** Efeito do tratamento com o EH na expressão da AKT no fígado de animais dos grupos (CTR), alimentados com dieta rica em sacarose (HSD) e tratados com o EH (HSD+0,25; HSD+0,50). **C.** Efeito do tratamento com o EH na expressão da GRP78 no fígado de animais dos grupos (CTR), alimentados com dieta rica em sacarose (HSD) e tratados com o EH (HSD+0,25; HSD+0,50). As barras representam média  $\pm$  epm. One-way ANOVA (Newman Keuls). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  comparado ao CTR, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparado ao HSD.

#### *O EH não afeta a diversidade microbiana de animais HSD*

A análise da abundância relativa de espécies bacterianas mostrou que o consumo de uma dieta rica em sacarose foi capaz de modificar a composição da microbiota intestinal dos animais. A análise ao nível de filo mostrou que a dieta HSD aumentou a proporção de espécies do filo firmicutes. Esse dado é caracterizado pelo aumento na abundância relativa de espécies bacterianas do gênero *Blautia*, pertencente a esse filo. A mesma análise mostrou que não houve diferença quanto à abundância relativa de espécies dos grupos tratados com o EH, quando comparados ao grupo HSD (Fig. 5A).

Para avaliar se a dieta HSD modificou a diversidade microbiana e se o tratamento com o extrato de *S. cumini* poderia alterar esse parâmetro, foram calculados os índices de  $\alpha$  (alfa) e  $\beta$  (beta) diversidade. Observamos que a dieta reduziu a diversidade de espécies no grupo HSD em relação ao grupo CTR de acordo com o índice de Shannon. Porém, nenhuma diferença quanto ao número de espécies foi observada nos grupos HSD tratados com o EH, em ambas as doses, quando comparado ao grupo HSD (Fig. 5B).

A Análise multivariada permutacional de variância não-paramétrica (PERMANOVA) para a matriz de Bray Curtis, revelou diferenças entre o grupo CTR, o grupo HSD e os grupos tratados com o EH ( $R^2 = 0,29091$ ,  $p = 0.001$ , PERMANOVA). Porém, ao avaliar o efeito do tratamento com o EH nos animais HSD (HSD+0,25 e HSD+0,50), nas duas doses, nenhuma diferença em relação à  $\beta$ -diversidade foi observada em comparação ao grupo HSD ( $R^2 = 0,08161$ ,  $p = 0.537$ , PERMANOVA). Além disso, a beta diversidade calculada pelo índice de Bray Curtis mostrou que os animais CTR e HSD separam-se claramente formando grupos específicos dentro da Análise das Principais Coordenadas (PCoA) (Fig. 5C). Particularmente, a distribuição dos animais ao longo do eixo PC1 reflete a diferença no perfil da microbiota intestinal entre os grupos CTR e HSD, respondendo por 37% da variação entre eles. Entretanto, embora existam diferenças na proporção relativa de alguns grupos bacterianos identificados, a beta diversidade permaneceu similar entre os animais do grupo HSD e os animais dos grupos HSD tratados com o EH nas duas doses (HSD+0,25 e HSD+0,50). Dessa forma, esse dado confirma a capacidade da dieta HSD em modificar a composição da microbiota intestinal e, também de que o EH não teve qualquer efeito sobre a composição da mesma.



**Figura 5.** Avaliação do efeito do EH sobre a microbiota intestinal. Abundância relativa dos 25 gêneros mais abundantes (A) Alfa diversidade calculada pelo Índice de Shannon (B). Análise das principais coordenadas (PCoA) usando o índice de dissimilaridade de Bray Curtis (C) avaliados nos animais alimentados com a dieta padrão (CTR, n=6), com a dieta rica em sacarose (HSD, n=8), animais alimentados com a dieta rica em sacarose e tratados com o EH nas doses de 0,25g/Kg (HSD+0,25, n=7) e 0,50g/Kg (HSD+0,50, n=7) após o período de 5 semanas. A análise estatística para o cálculo da  $\beta$ -diversidade entre os grupos foi realizada pelo teste de Análise multivariada permutacional de variância não-paramétrico (PERMANOVA, 999 Monte Carlo permutations).



## DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos o efeito do tratamento por 5 semanas com extrato hidroalcoólico (EH) das folhas de *Syzygium cumini* sobre ratos dislipidêmicos e com esteatose hepática induzida por uma dieta rica em sacarose (HSD). Ratos *Wistar* HSD tratados com o EH apresentaram glicemias de jejum menores quando comparados aos animais HSD. Isso demonstra a capacidade do EH em reverter hiperglicemia desses animais. Esse efeito foi corroborado pela melhora das intolerâncias à glicose e insulina e normalização dos índices TyG e HOMA1-IR, como também a redução dos níveis séricos de insulina nos animais HSD tratados com o EH.

Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores do nosso grupo em que o efeito desse EH sobre o perfil glicêmico e sensibilidade a insulina foram avaliados em ratos obesos induzidos pelo MSG. Por exemplo, França et al. (2019) demonstraram que ratos obesos MSG tratados por 8 semanas com o EH nas doses de 0,5 e 1,0g/Kg/dia apresentaram uma redução significativa nos níveis glicêmicos de jejum quando comparados aos animais não tratados (Franca et al. 2019). O EH também melhorou a intolerância à glicose e a sensibilidade à insulina em outro estudo com ratos obesos-MSG (Sanches et al. 2016). Embora esses resultados sejam semelhantes ao de outros estudos, o nosso trabalho é o primeiro a avaliar o efeito do EH das folhas sobre parâmetros metabólicos de animais alimentados com dieta rica em sacarose.

Efeitos anti-hiperglicemiante e de melhora da sensibilidade insulínica já foram observados em modelos diabetes experimental tratados com várias partes da planta. Baldissera et al. (2016) demonstraram que ratos com diabetes induzida por dieta rica em gordura e estreptozotocina (STZ) tratados com o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *S. cumini* por 6 semanas apresentaram redução nos níveis glicêmicos quando comparados aos níveis glicêmicos dos animais diabéticos (Baldissera et al. 2016). Resultados semelhantes foram encontrados em ratos diabéticos STZ tratados (500 mg/kg) por 21 dias com vários extratos da

casca (Tripathi and Kohli 2014). Além disso, a suplementação (8 semanas) com 2,5% do pó das sementes na dieta de ratos alimentados com dieta rica em gordura (DRG) restabeleceu a tolerância à glicose, a sensibilidade a insulina, assim como, a insulinemia dos animais (Ulla et al. 2017).

Uma possível explicação para o efeito anti-hiperglicêmico do EH está associada ao seu potencial antioxidante através do sequestro de radicais livres como já demonstrado pelo nosso grupo (Chagas et al. 2018; Sanches et al. 2016). Essa ação pode aumentar a sensibilidade insulínica em órgãos periféricos como, TAB, fígado e músculo esquelético, restabelecendo, dessa forma, os níveis glicêmicos na circulação (Tzeng, Liou, and Liu 2011). Além disso, uma maior da atividade antioxidante aumenta a proteção das células beta do pâncreas contra a morte celular induzida por citocinas pró-inflamatórias, favorecendo a adequada secreção de insulina (Ding et al. 2012). Acredita-se que os efeitos citados acima estejam associados à presença de polifenóis como a miricetina e seus derivados (Baldissera et al. 2016; Choi et al. 2014; Sanches et al. 2016).

De acordo com os índices TyG e HOMA1-IR, os animais alimentados com HSD apresentaram resistência insulínica, sendo que o EH nas duas doses restabeleceu a sensibilidade insulínica dos animais HSD. Esse dado está de acordo com a melhora da intolerância a glicose e a insulina promovida pelo extrato nas duas doses avaliadas. Essa melhora da sensibilidade a insulina nos animais HSD tratados com o extrato é corroborado pela diminuição dos níveis de TG nesses animais.

A hipertrigliceridemia é um fator de risco direto para doenças cardiovasculares (Nordestgaard and Varbo 2014). Como era de se esperar, os níveis de TG dos animais HSD se mostraram elevados a partir de 90 dias de consumo da dieta e permanecendo elevado até o final do período de indução de obesidade. Em estudos anteriores do nosso grupo foram observadas elevações das concentrações séricas de TG em animais alimentados com a dieta rica em

sacarose bem antes do aumento da glicemia (Pinto, Melo, Flister, Franca, et al. 2016; Sousa et al. 2018). Portanto, a hipertrigliceridemia tem sido a primeira e mais presente alteração promovida por este tipo de dieta. Em nosso estudo, após o período de 5 semanas de tratamento com o EH, observou-se que o extrato foi capaz de reduzir a hipertrigliceridemia dos animais HDS nas duas doses testadas.

Esse resultado é corroborado por dados anteriores do nosso grupo em que ratos obesos-MSG hipertrigliceridêmicos apresentaram uma redução significativa dos TG após o tratamento com o EH nas doses de 0,5 e 1,0 g/kg (Franca et al. 2019; Sanches et al. 2016). Assim, este trabalho demonstra que uma dose de 0,25 g/kg do EH pode ser capaz de ter efeitos semelhantes sobre esse lipídeo sanguíneo como as maiores (0,5 e 1,0 g/kg) já testadas. Com relação a atividade anti-hipertrigliceridêmica do extrato, França *et al.* (2019) sugerem que esse efeito esteja associado a capacidade dele em inibir a expressão e atividade da via XBP-1s/PDI/MTP, reduzindo, assim, a incorporação e exportação de triglicerídeos através das partículas de VLDL (Franca et al. 2019).

Schoenfelder et al. (2008) realizaram um tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *S. cumini* em animais com diabetes induzida por aloxana e observaram que houve redução significativa dos TG séricos. Os autores também observaram que os melhores resultados foram apresentados pelas doses de 0,125 g/Kg e 0,5 g/Kg (Schoenfelder et al. 2010). Resultados semelhantes foram demonstrados em outro estudo em animais com diabetes induzida por DRG e STZ (Baldissera et al. 2016). Outros estudos que usaram o extrato das sementes em animais diabéticos STZ (Ravi, Rajasekaran, and Subramanian 2005b; Sharma, Balomajumder, and Roy 2008a) ou adicionaram o pó das sementes a dieta de animais com obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura (Ulla et al. 2017) também demonstraram o efeito anti-hipertrigliceridêmico de *S. cumini*.

A hipertrigliceridemia é consequência direta do maior aporte e síntese de gordura hepática (Perdomo, Fruhbeck, and Escalada 2019). Como demonstrado em trabalho do grupo em camundongos, a HSD é capaz de induzir DHGNA nos animais a partir de 8 semanas de exposição (Flister et al. 2018). Corroborando com esse dado, os ratos HSD deste trabalho apresentaram DHGNA e o tratamento com EH nas duas doses foi capaz de inibir o aparecimento dessa patologia. França *et al.* (2019) demonstraram que o tratamento de ratos obesos-MSG com o EH foi capaz de reverter a esteatose hepática desses animais. No entanto, o tempo de tratamento utilizado neste estudo foi de 8 semanas com doses de EH de 0,5 e 1,0 g/kg (Franca et al. 2019).

Como apresentado por Chagas et al. (2015), há vários compostos fenólicos identificados no *S. cumini* que podem melhorar distúrbios metabólicos como a esteatose hepática (Chagas et al. 2015). Efeito observado em ratos obesos com DHGNA tratados tanto com o extrato bruto das folhas (Franca et al. 2019) como com o pó das sementes (Ulla et al. 2017) de *S. cumini*. Outros extratos ricos em polifenóis também reduzem o acúmulo de gordura hepática tanto em animais como em humanos. Por exemplo, o tratamento de camundongos com 200 mg/Kg de extrato de cereja rico em polifenóis por 15 semanas reduziu o acúmulo de lipídios no fígado de animais alimentados com DRG. Em outro estudo, pacientes com obesidade e DHGNA que receberam cápsulas contendo 450 mg do extrato de *Hibiscus sabdariffa* L., constituído por flavonoides, antocianinas e ácido fenólico, apresentaram redução em vários parâmetros metabólicos, entre eles, redução do acúmulo de gordura hepática (Chang et al. 2014).

A RI é um dos principais fatores que contribuem para o acúmulo de gordura nos hepatócitos (Brown and Goldstein 2008). O estoque de glicogênio no fígado é um indicativo de sensibilidade insulínica neste órgão, uma vez que a insulina induz a síntese e a RI favorece a quebra e, conseqüentemente, diminuição desse polissacarídeo (Petersen, Vatner, and Shulman 2017). Neste

trabalho, o consumo de dieta com 25% de sacarose promoveu redução do conteúdo de glicogênio hepático, que foi atenuado pelo tratamento com o EH nas duas doses avaliadas.

Existem poucos estudos que avaliaram o efeito de extratos ricos em polifenóis sobre o conteúdo hepático de glicogênio. Dentre os trabalhos, destaca-se o de Kumarappan et al. (2012), que observaram redução do glicogênio no fígado de ratos diabéticos induzidos por STZ após o tratamento por seis semanas com o extrato das folhas de *Ichnocarpus frutescens* (300 mg/kg). Em outro trabalho, Gandhi et al. (2014) constataram que o tratamento (200 e 400 mg/kg) por 30 dias com o extrato metanólico dos feijões de *Cyamopsis tetragonoloba* diminuíram o conteúdo de glicogênio hepático de ratos diabéticos induzidos por STZ e DRG de forma dose dependente. Ademais, o EH pode estar agindo sobre o metabolismo hepático do glicogênio através do seu principal composto, a miricetina (Sanches et al. 2016), visto que esse polifenol aumenta a síntese de glicogênio em hepatócitos isolados de ratos STZ de uma maneira dependente da concentração (0,01 a 10,0  $\mu\text{mol/L}$ ) (Liu et al. 2005). A miricetina também foi capaz de aumentar o conteúdo hepático de glicogênio de ratos STZ após dois dias de tratamento (3 mg/ 12 h, via intraperitoneal). Efeito que foi explicado pela maior atividade do glicogênio sintase I no fígado desses animais diabéticos (Ong and Khoo 2000).

Na sinalização insulínica, a via da PI3K/AKT é o principal *downstream* responsável pela maioria dos efeitos metabólicos promovidos por esse hormônio. No fígado, a ativação dessa via diminui a gliconeogênese, aumenta a síntese de glicogênio e induz síntese de TG, sendo a hiperinsulinemia um dos principais responsáveis pela lipogênese *de novo* no hepatócito (Chao et al. 2019). Neste estudo, os animais HSD apresentaram uma redução na expressão da AKT no fígado, a qual foi revertida pelo tratamento com o EH nas duas doses. A redução da expressão da AKT corrobora com a diminuição da síntese de glicogênio hepático, evidenciando uma possível RI hepática nos animais HSD. Ao mesmo tempo, o aumento da expressão da Akt promovida pelo EH indica melhora na sinalização insulínica hepática desses animais.

Não há estudos que avaliem o efeito de extratos ricos em polifenóis sobre a expressão da AKT hepática de animais alimentados apenas com dietas ricas em açúcares. Todavia, a ação desse fitocomplexo de várias espécies vegetais já foi descrita em outros modelos de SM experimental. Por exemplo, extratos polifenólicos da semente (Rameshrad et al. 2019) e da casca (Santos et al. 2017) da uva (*Vitis vinifera*) foram capazes de melhorar a sinalização da AKT hepática em animais com SM induzida por bisfenol A e DRG, respectivamente. Ademais, outros vegetais ricos em polifenóis além de aumentarem a atividade da via da AKT, também promovem redução da esteatose hepática. Isso foi observado em ratos obesos Zucker suplementados (4% por 7 semanas) com *Opuntia ficus* (Moran-Ramos et al. 2012) e em camundongos alimentados com dieta rica em frutose e gordura e tratados com extrato etanólico de frutas vermelhas da região norte (ex: amora-preta, arando-vermelho e acerola alpina) (Anhe et al. 2018).

Dentre os polifenóis do EH, também se destaca a ação da miricetina, que apesar de não haver estudos que avaliem o seu efeito na via da AKT hepática, há outros que demonstram que a administração intraperitoneal (1,0 mg/kg, 3x ao dia) desse flavonoide por 14 dias aumentou a expressão tanto da AKT total como do GLUT 4 no músculo sóleo de ratos alimentados por 6 semanas com dieta enriquecida com 60% de frutose (Liu et al. 2007; Tzeng, Liou, and Liu 2011). Efeito que foi explicado pelo aumento da produção  $\beta$ -endorfina nesses animais tratados com a miricetina (Tzeng, Liou, and Liu 2011).

O acúmulo de gordura no fígado favorece a ativação do estresse do retículo endoplasmático (RE), que induz maior síntese de TG, mantendo um ciclo vicioso (Baiceanu et al. 2016). Assim, junto com a hiperinsulinemia e a RI, o estresse do RE tem papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da DHGNA. SREBP1c é o principal fator de transcrição lipogênico no fígado ativado por esses mecanismos, sendo, assim, o grande responsável pela lipogênese *de novo* nesse órgão (Ferre and Foufelle 2010). A *glucose-regulated protein 78*

(GRP78) é a chaperona mais abundante no RE. Ela apresenta duas funções clássicas no controle da homeostase dessa organela: o enovelamento proteico e a inibição dos três sensores do estresse do RE (IRE1 $\alpha$ , PERK e ATF6) (Hetz, Chevet, and Oakes 2015).

Neste estudo constatou-se que os animais HSD apresentaram diminuição da expressão da GRP78 hepática, sugerindo ativação do estresse do RE nesse órgão. A diminuição hepática dessa proteína também foi comprovado em outros modelos de SM como o rato Zucker (Szanto et al. 1995) e o camundongo *db/db* (Yamagishi et al. 2012). Entretanto, o tratamento com EH restaurou a expressão dessa proteína nos ratos alimentados com excesso de sacarose. Além do controle da homeostase do RE, a GRP78 parece ter um papel determinante no metabolismo glico-lipídico hepático. Por exemplo, a super expressão da GRP78 no fígado de camundongos *ob/ob* diminui a maturação e a expressão da SREBP1c com conseqüente redução do acúmulo de lipídeos e melhora da sensibilidade insulínica hepática (Kammoun et al. 2009). Esse efeito deve estar relacionado, em parte, à melhora do estresse do RE, o que diminui a ativação da SREBP1c (Ferre and Foufelle 2010). Além disso, a GRP78 é capaz de ativar AMPK hepática, isso tanto reduz a lipogênese via inibição da SREBP1c, como inibe a gliconeogênese e estimula a síntese de glicogênio via AKT (Gupta et al. 2019).

Estudos indicam duas vias de interação entre polifenóis e a microbiota intestinal: a microbiota pode metabolizar os polifenóis, assim como os polifenóis e seus metabólitos, podem modular a microbiota intestinal inibindo a proliferação de bactérias patogênicas e favorecendo o crescimento de bactérias benéficas. Essa interação recíproca entre polifenóis e a microbiota intestinal pode contribuir para a saúde do hospedeiro (Corrêa et al. 2019). Tendo em vista essa interação, nós resolvemos investigar a capacidade do EH em modular a microbiota intestinal e, dessa forma, buscar entender se o mecanismo pelo qual o EH melhora os parâmetros glico-lipídicos dos animais poderia ser através dessa modulação.

Foi observado que o EH não foi capaz de modular a microbiota intestinal dos animais HSD após 5 semanas de tratamento com as duas doses. O perfil da microbiota dos animais CTR é totalmente diferente do perfil dos animais HSD. A dieta rica em sacarose promoveu o aumento da abundância de grupos pertencentes ao filo Firmicutes, entre eles grupos bacterianos específicos representados por espécies do gênero *Blautia*, pertencente à família *Lachnospiraceae*. Alguns estudos associaram as espécies desse gênero com a obesidade, elevado BMI (Kasai et al. 2015; Bonder et al. 2016; Org et al. 2017), acúmulo de gordura visceral (Ozato et al. 2019), DHGNA e EHNA (Shen, Zheng, et al. 2017; Del Chierico et al. 2017).

O nosso resultado é discordante de outros estudos com extratos ricos em polifenóis. Animais cuja dieta foi suplementada com extrato de Blueberry por 8 semanas apresentaram mudanças na composição da microbiota intestinal caracterizada por uma redução na abundância de Firmicutes. Essas mudanças na composição da microbiota foram associadas a uma melhora no efeito de barreira do epitélio intestinal, com consequente redução da inflamação sistêmica e melhora da resistência insulínica hepática dos animais obesos (Lee et al. 2018). Extratos ricos em polifenóis de uva Concord tinto (Roopchand et al. 2015) e cranberry (Anhe et al. 2015) apresentaram efeitos semelhantes sobre ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura (DRG), reduzindo o ganho de peso corporal e a melhorando a sensibilidade insulínica. Além disso, ambos extratos aumentaram a abundância de *Akkermansia muciniphila* nesses animais alimentados com a DRG. Ademais, o extrato rico em polifenóis de artic berry foi capaz de melhorar a endotoxemia metabólica, resistência insulínica e esteatose hepática em animais obesos induzidos por dieta rica em açúcar/gordura, como também favoreceu o crescimento de *A. muciniphila* (Anhe et al. 2018). Henning et al. (2018) ao suplementar a dieta rica em açúcar/gordura de camundongos com extratos de chá verde e preto rico em polifenóis observou a redução da razão de Firmicutes /Bacteroidetes. Além disso, o chá verde favoreceu o



crescimento de bactérias do gênero *Clostridium e Coprococcus*. Os autores concluíram que o efeito anti-obesogênico promovido pelos extratos está associado à modulação da microbiota intestinal (Henning et al. 2018).

## CONCLUSÃO

Esse é o primeiro estudo que avalia o efeito do extrato hidroalcoólico rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* sobre animais alimentado com dieta rica em sacarose. Dentre os principais resultados, destaca-se que o tratamento foi capaz de reduzir a hiperglicemia e a hipertrigliceridemia de ratos alimentados com dieta. Além disso, o extrato também reduziu a DHGNA e aumentou o glicogênio hepático desses animais. Efeitos que foram associados ao aumento das expressões proteicas da AKT e GRP78 no fígado. Portanto, os nossos resultados reiteram a capacidade do EH em melhorar as alterações glico-lipídicas de animais com SM. Além disso, também destaca-se a GRP78 como potencial alvo terapêutico para essas desordens.

Porém o EH não foi capaz de modular a microbiota intestinal dos animais HSD. Os mecanismos pelos quais os polifenóis modulam a microbiota precisam ainda ser compreendidos. Entretanto, é importante considerar a estrutura do polifenol, pois esta influencia na sua absorção, a dose avaliada e os microorganismos presentes no momento da interação (Cardona et al. 2013). Dessa forma, o mecanismo pelo qual o EH melhora os parâmetros glico-lipídicos de animais com a SM não parece envolver a modulação da microbiota intestinal.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados descritos neste trabalho mostram que o consumo crônico de uma dieta rica em sacarose, logo após o desmame, altera a composição da microbiota intestinal, reduzindo a diversidade microbiana e favorecendo o aumento de grupos bacterianos associados a produção de ácidos graxos de cadeia curta e ao desenvolvimento de fatores de risco associados à SM. Enfatizamos também que o modelo de dieta usado neste estudo apresenta uma concentração de sacarose semelhante ao seu consumo pelas populações de países da América Latina.

O nosso estudo também demonstrou a capacidade do extrato das folhas de *S. cumini* em reduzir a hiperglicemia, a hipertrigliciridemia e a esteatose hepática de ratos alimentados com a dieta rica em sacarose. Dessa forma, os nossos resultados corroboram com estudos anteriores do nosso grupo que também demonstraram a capacidade do EH em melhorar as alterações glico-lipídicas de animais com SM. Entretanto, o EH não foi capaz de modificar a composição da microbiota intestinal desses animais expostos à um excesso de sacarose. Com isso, os mecanismos pelos quais os polifenóis modulam a microbiota ainda precisam ser melhor compreendidos.

Portanto, sugerimos que um provável mecanismo pelo qual o EH melhora as alterações glico-lipídicas de animais com SM esteja associado a capacidade dele em inibir a expressão e atividade da via XBP-1s/PDI/MTP, reduzindo, assim, a incorporação e exportação de triglicerídeos através das partículas de VLDL, dado demonstrado por estudo anterior do nosso grupo.

## Referências

- Abenavoli, L., N. Milic, F. Luzzza, L. Boccuto, and A. De Lorenzo. 2017. "Polyphenols Treatment in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *J Transl Int Med* 5 (3):144-7. doi: 10.1515/jtim-2017-0027.
- Aguilar, M., T. Bhuket, S. Torres, B. Liu, and R. J. Wong. 2015. "Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012." *Jama* 313 (19):1973-4. doi: 10.1001/jama.2015.4260.
- Ahn, J., H. Lee, S. Kim, J. Park, and T. Ha. 2008. "The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways." *Biochem Biophys Res Commun* 373 (4):545-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.077.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, C. M. Loria, and S. C. Smith, Jr. 2009. "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* 120 (16):1640-5. doi: 10.1161/circulationaha.109.192644.
- Alcock, J., C. C. Maley, and C. A. Aktipis. 2014. "Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms." *Bioessays* 36 (10):940-9. doi: 10.1002/bies.201400071.
- Ali, I., R. J. Conrad, E. Verdin, and M. Ott. 2018. "Lysine Acetylation Goes Global: From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics." *Chem Rev* 118 (3):1216-52. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00181.
- Anandharajan, R., S. Jaiganesh, N. P. Shankernarayanan, R. A. Viswakarma, and A. Balakrishnan. 2006. "In vitro glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of Glut-4, PI3 kinase and PPARgamma in L6 myotubes." *Phytomedicine* 13 (6):434-41. doi: 10.1016/j.phymed.2005.03.008.
- Anhe, F. F., D. Roy, G. Pilon, S. Dudonne, S. Matamoros, T. V. Varin, C. Garofalo, et al. 2015. "A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice." *Gut* 64 (6):872-83. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307142.
- Anhê, F. F., T. V. Varin, M. Le Barz, G. Pilon, S. Dudonné, J. Trottier, P. St-Pierre, et al. 2018. "Arctic berry extracts target the gut-liver axis to alleviate metabolic endotoxaemia, insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obese mice." *Diabetologia* 61 (4):919-31. doi: 10.1007/s00125-017-4520-z.
- Anhe, F. F., T. V. Varin, M. Le Barz, G. Pilon, S. Dudonne, J. Trottier, P. St-Pierre, et al. 2018. "Arctic berry extracts target the gut-liver axis to alleviate metabolic endotoxaemia, insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obese mice." *Diabetologia* 61 (4):919-31. doi: 10.1007/s00125-017-4520-z.
- Aoki, R., K. Kamikado, W. Suda, H. Takii, Y. Mikami, N. Suganuma, M. Hattori, and Y. Koga. 2017. "A proliferative probiotic *Bifidobacterium* strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation." *Sci Rep* 7:43522. doi: 10.1038/srep43522.
- Aqil, F., A. Gupta, R. Munagala, J. Jeyabalan, H. Kausar, R. J. Sharma, I. P. Singh, and R. C. Gupta. 2012. "Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry)." *Nutr Cancer* 64 (3):428-38. doi: 10.1080/01635581.2012.657766.
- Arenaza, L., M. Medrano, M. Oses, I. Huybrechts, I. Díez, H. Henriksson, and I. Labayen. 2019. "Dietary determinants of hepatic fat content and insulin resistance in overweight/obese children: a cross-sectional analysis of the Prevention of Diabetes in Kids (PREDIKID) study." *Br J Nutr* 121 (10):1158-65. doi: 10.1017/s0007114519000436.

- Arias-Alvarado, A., M. Aghayev, S. Ilchenko, N. Rachdaoui, J. Lepp, T. H. Tsai, G. F. Zhang, S. Previs, and T. Kasumov. 2021. "Measuring acetyl-CoA and acetylated histone turnover in vivo: Effect of a high fat diet." *Anal Biochem* 615:114067. doi: 10.1016/j.ab.2020.114067.
- Armougom, F., M. Henry, B. Vialettes, D. Raccach, and D. Raoult. 2009. "Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients." *PLoS One* 4 (9):e7125. doi: 10.1371/journal.pone.0007125.
- Aron-Wisniewsky, J., C. Vigliotti, J. Witjes, P. Le, A. G. Holleboom, J. Verheij, M. Nieuwdorp, and K. Clément. 2020. "Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17 (5):279-97. doi: 10.1038/s41575-020-0269-9.
- Arun, R., M. V. Prakash, S. K. Abraham, and K. Premkumar. 2011a. "Role of *Syzygium cumini* seed extract in the chemoprevention of in vivo genomic damage and oxidative stress." *J Ethnopharmacol* 134 (2):329-33. doi: 10.1016/j.jep.2010.12.014.
- Arun, Renganathan, M Velayutham Dass Prakash, Suresh K Abraham, and Kumpati Premkumar. 2011b. "Role of *Syzygium cumini* seed extract in the chemoprevention of in vivo genomic damage and oxidative stress." *Journal of Ethnopharmacology* 134 (2):329-33.
- Ayyanar, M., and P. Subash-Babu. 2012. "*Syzygium cumini* (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses." *Asian Pac J Trop Biomed* 2 (3):240-6. doi: 10.1016/s2221-1691(12)60050-1.
- Baboota, R. K., P. Khare, P. Mangal, D. P. Singh, K. K. Bhutani, K. K. Kondepudi, J. Kaur, and M. Bishnoi. 2018. "Dihydrocapsiate supplementation prevented high-fat diet-induced adiposity, hepatic steatosis, glucose intolerance, and gut morphological alterations in mice." *Nutr Res* 51:40-56. doi: 10.1016/j.nutres.2017.11.006.
- Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. 2004. "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (44):15718-23. doi: 10.1073/pnas.0407076101.
- Bäckhed, F., J. K. Manchester, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. 2007. "Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (3):979-84. doi: 10.1073/pnas.0605374104.
- Backhed, F., J. Roswall, Y. Peng, Q. Feng, H. Jia, P. Kovatcheva-Datchary, Y. Li, et al. 2015. "Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life." *Cell Host Microbe* 17 (5):690-703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.
- Baeza, J., M. J. Smallegan, and J. M. Denu. 2015. "Site-specific reactivity of nonenzymatic lysine acetylation." *ACS Chem Biol* 10 (1):122-8. doi: 10.1021/cb500848p.
- Baiceanu, Andrei, Pierre Mesdom, Marie Lagouge, and Fabienne Foufelle. 2016. "Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis." *Nature Reviews Endocrinology*.
- Baldissera, G., N. D. Sperotto, H. T. Rosa, J. G. Henn, V. F. Peres, D. J. Moura, R. Roehrs, et al. 2016. "Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin." *J Ethnopharmacol* 194:1012-21. doi: 10.1016/j.jep.2016.10.056.
- Baliga, Manjeshwar Shrinath, Harshith P Bhat, Bantwal Raghavendra Vittaldas Baliga, Rajesh Wilson, and Princy Louis Palatty. 2011. "Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam.(black plum): a review." *Food Research International* 44 (7):1776-89.
- Baothman, O. A., M. A. Zamzami, I. Taher, J. Abubaker, and M. Abu-Farha. 2016. "The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes." *Lipids Health Dis* 15:108. doi: 10.1186/s12944-016-0278-4.
- Bardy, G., A. Virsolvy, J. F. Quignard, M. A. Ravier, G. Bertrand, S. Dalle, G. Cros, R. Magous, S. Richard, and C. Oiry. 2013. "Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells." *Br J Pharmacol* 169 (5):1102-13. doi: 10.1111/bph.12194.
- Bartram, A. K., M. D. Lynch, J. C. Stearns, G. Moreno-Hagelsieb, and J. D. Neufeld. 2011. "Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial

- communities by assembling paired-end illumina reads." *Appl Environ Microbiol* 77 (11):3846-52. doi: 10.1128/aem.02772-10.
- Bechmann, L. P., R. A. Hannivoort, G. Gerken, G. S. Hotamisligil, M. Trauner, and A. Canbay. 2012. "The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases." *J Hepatol* 56 (4):952-64. doi: 10.1016/j.jhep.2011.08.025.
- Becker, C., M. F. Neurath, and S. Wirtz. 2015. "The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease." *Ilar j* 56 (2):192-204. doi: 10.1093/ilar/ilv030.
- Bernardis, L. L., and B. D. Patterson. 1968. "Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions." *J Endocrinol* 40 (4):527-8. doi: 10.1677/joe.0.0400527.
- Bhandary, M. J., K. R. Chandrashekar, and K. M. Kaveriappa. 1995. "Medical ethnobotany of the Siddis of Uttara Kannada district, Karnataka, India." *J Ethnopharmacol* 47 (3):149-58. doi: 10.1016/0378-8741(95)01274-h.
- Bhattarai, Y., D. A. Muniz Pedrego, and P. C. Kashyap. 2017. "Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder?" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312 (1):G52-g62. doi: 10.1152/ajpgi.00338.2016.
- Bialonska, D., P. Ramnani, S. G. Kasimsetty, K. R. Muntha, G. R. Gibson, and D. Ferreira. 2010. "The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota." *Int J Food Microbiol* 140 (2-3):175-82. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.038.
- Biddinger, S. B., A. Hernandez-Ono, C. Rask-Madsen, J. T. Haas, J. O. Alemán, R. Suzuki, E. F. Scapa, et al. 2008. "Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis." *Cell Metab* 7 (2):125-34. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.013.
- Blüher, M. 2019. "Obesity: global epidemiology and pathogenesis." *Nat Rev Endocrinol* 15 (5):288-98. doi: 10.1038/s41574-019-0176-8.
- Boets, E., S. V. Gomand, L. Deroover, T. Preston, K. Vermeulen, V. De Preter, H. M. Hamer, et al. 2017. "Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study." *J Physiol* 595 (2):541-55. doi: 10.1113/JP272613.
- Bok, S. H., S. Y. Park, Y. B. Park, M. K. Lee, S. M. Jeon, T. S. Jeong, and M. S. Choi. 2002. "Quercetin dihydrate and gallate supplements lower plasma and hepatic lipids and change activities of hepatic antioxidant enzymes in high cholesterol-fed rats." *Int J Vitam Nutr Res* 72 (3):161-9. doi: 10.1024/0300-9831.72.3.161.
- Bolognini, Daniele, Andrew B. Tobin, Graeme Milligan, and Catherine E. Moss. 2016. "The Pharmacology and Function of Receptors for Short-Chain Fatty Acids." *Molecular Pharmacology* 89 (3):388-98. doi: 10.1124/mol.115.102301.
- Bonder, M. J., A. Kurilshikov, E. F. Tigchelaar, Z. Mujagic, F. Imhann, A. V. Vila, P. Deelen, et al. 2016. "The effect of host genetics on the gut microbiome." *Nat Genet* 48 (11):1407-12. doi: 10.1038/ng.3663.
- Boursier, Jerome, and Anna Mae Diehl. 2016. "Nonalcoholic fatty liver disease and the gut microbiome." *Clinics in liver disease* 20 (2):263-75.
- Brahe, L. K., A. Astrup, and L. H. Larsen. 2016. "Can We Prevent Obesity-Related Metabolic Diseases by Dietary Modulation of the Gut Microbiota?" *Adv Nutr* 7 (1):90-101. doi: 10.3945/an.115.010587.
- Brandt, N., D. Kotowska, C. M. Kristensen, J. Olesen, D. O. Lutzhoft, J. F. Halling, M. Hansen, et al. 2018. "The impact of exercise training and resveratrol supplementation on gut microbiota composition in high-fat diet fed mice." *Physiol Rep* 6 (20):e13881. doi: 10.14814/phy2.13881.
- BRASIL, and Ministério da Saúde. 2009. "RENISUS–Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais." In.: DAF/SCTIE/MS–RENISUS.
- BRASIL, RENISUS. 2009. "Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS." *portal.saúde.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf*. Accessed in: 07/24/2016.
- Bray, G. A., and B. M. Popkin. 2014. "Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar." *Diabetes Care* 37 (4):950-6. doi: 10.2337/dc13-2085.

- Bresson, Jean-Louis, Albert Flynn, Marina Heinonen, Karin Hulshof, Hannu Korhonen, Pagona Lagiou, Martinus Løvik, Rosangela Marchelli, Ambroise Martin, and Bevan Moseley. 2009. "Review of Labelling Reference Intake Values—Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a Request from the Commission Related to the Review of Labelling Reference Intake Values for Selected Nutritional Elements." *EFSA J* 1008:1-14.
- Brown, A. J., S. M. Goldsworthy, A. A. Barnes, M. M. Eilert, L. Tcheang, D. Daniels, A. I. Muir, et al. 2003. "The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids." *J Biol Chem* 278 (13):11312-9. doi: 10.1074/jbc.M211609200.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 2008. "Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox." *Cell Metab* 7 (2):95-6. doi: 10.1016/j.cmet.2007.12.009.
- Brun, P., I. Castagliuolo, V. Di Leo, A. Buda, M. Pinzani, G. Palu, and D. Martines. 2007. "Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292 (2):G518-25. doi: 10.1152/ajpgi.00024.2006.
- Bruun, J. M., J. W. Helge, B. Richelsen, and B. Stallknecht. 2006. "Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 (5):E961-7. doi: 10.1152/ajpendo.00506.2005.
- Byrne, C. D., R. Olufadi, K. D. Bruce, F. R. Cagampang, and M. H. Ahmed. 2009. "Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease." *Clin Sci (Lond)* 116 (7):539-64. doi: 10.1042/CS20080253.
- Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. Johnson, and S. P. Holmes. 2016a. "DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data." *Nat Methods* 13 (7):581-3. doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Callahan, Benjamin J, Paul J McMurdie, Michael J Rosen, Andrew W Han, Amy Jo A Johnson, and Susan P Holmes. 2016b. "DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data." *Nature methods* 13 (7):581-3.
- Canfora, E. E., J. W. Jocken, and E. E. Blaak. 2015. "Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity." *Nat Rev Endocrinol* 11 (10):577-91. doi: 10.1038/nrendo.2015.128.
- Canfora, E. E., R. C. R. Meex, K. Venema, and E. E. Blaak. 2019. "Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM." *Nat Rev Endocrinol* 15 (5):261-73. doi: 10.1038/s41574-019-0156-z.
- Cani, P. D. 2018. "Human gut microbiome: hopes, threats and promises." *Gut* 67 (9):1716-25. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316723.
- . 2019. "Microbiota and metabolites in metabolic diseases." *Nat Rev Endocrinol* 15 (2):69-70. doi: 10.1038/s41574-018-0143-9.
- Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, et al. 2007. "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* 56 (7):1761-72. doi: 10.2337/db06-1491.
- Cani, P. D., and B. F. Jordan. 2018. "Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15 (11):671-82. doi: 10.1038/s41575-018-0025-6.
- Cani, P. D., E. Lecourt, E. M. Dewulf, F. M. Sohet, B. D. Pachikian, D. Naslain, F. De Backer, A. M. Neyrinck, and N. M. Delzenne. 2009. "Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal." *Am J Clin Nutr* 90 (5):1236-43. doi: 10.3945/ajcn.2009.28095.
- Cani, P. D., M. Osto, L. Geurts, and A. Everard. 2012. "Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity." *Gut Microbes* 3 (4):279-88. doi: 10.4161/gmic.19625.
- "Capsaicin and Capsaicinoids." In. *Modern Alkaloids*, 73-109.
- Cardona, F., C. Andres-Lacueva, S. Tulipani, F. J. Tinahones, and M. I. Queipo-Ortuno. 2013. "Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health." *J Nutr Biochem* 24 (8):1415-22. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.001.

- Chagas, V. T., Rmrs Coelho, R. S. Gaspar, S. A. da Silva, M. Mastrogiovanni, C. J. Mendonca, M. N. S. Ribeiro, A. M. A. Paes, and A. Trostchansky. 2018. "Protective Effects of a Polyphenol-Rich Extract from *Syzygium cumini* (L.) Skeels Leaf on Oxidative Stress-Induced Diabetic Rats." *Oxid Med Cell Longev* 2018:5386079. doi: 10.1155/2018/5386079.
- Chagas, V. T., L. M. França, S. Malik, and A. M. Paes. 2015. "Syzygium cumini (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases." *Front Pharmacol* 6:259. doi: 10.3389/fphar.2015.00259.
- Chambers, E. S., A. Viardot, A. Psichas, D. J. Morrison, K. G. Murphy, S. E. Zac-Varghese, K. MacDougall, et al. 2015. "Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults." *Gut* 64 (11):1744-54. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307913.
- Chang, C. J., T. F. Tzeng, S. S. Liou, Y. S. Chang, and I. M. Liu. 2012. "Myricetin Increases Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Protein Expression and Decreases Plasma Lipids and Adiposity in Rats." *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:787152. doi: 10.1155/2012/787152.
- Chang, H. C., C. H. Peng, D. M. Yeh, E. S. Kao, and C. J. Wang. 2014. "Hibiscus sabdariffa extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans." *Food Funct* 5 (4):734-9. doi: 10.1039/c3fo60495k.
- Chao, H. W., S. W. Chao, H. Lin, H. C. Ku, and C. F. Cheng. 2019. "Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Int J Mol Sci* 20 (2). doi: 10.3390/ijms20020298.
- Chen, T., A. B. Liu, S. Sun, N. J. Ajami, M. C. Ross, H. Wang, L. Zhang, et al. 2019. "Green Tea Polyphenols Modify the Gut Microbiome in db/db Mice as Co-Abundance Groups Correlating with the Blood Glucose Lowering Effect." *Mol Nutr Food Res* 63 (8):e1801064. doi: 10.1002/mnfr.201801064.
- Chevalier, C., O. Stojanović, D. J. Colin, N. Suarez-Zamorano, V. Tarallo, C. Veyrat-Durebex, D. Rigo, et al. 2015. "Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold." *Cell* 163 (6):1360-74. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.004.
- Choi, H. N., M. J. Kang, S. J. Lee, and J. I. Kim. 2014. "Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet." *Nutr Res Pract* 8 (5):544-9. doi: 10.4162/nrp.2014.8.5.544.
- Choi, S. M., D. F. Tucker, D. N. Gross, R. M. Easton, L. M. DiPilato, A. S. Dean, B. R. Monks, and M. J. Birnbaum. 2010. "Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway." *Mol Cell Biol* 30 (21):5009-20. doi: 10.1128/mcb.00797-10.
- Clifford, M. N. 2004. "Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health." *Planta Med* 70 (12):1103-14. doi: 10.1055/s-2004-835835.
- Corrêa, T. A. F., M. M. Rogero, N. M. A. Hassimotto, and F. M. Lajolo. 2019. "The Two-Way Polyphenols-Microbiota Interactions and Their Effects on Obesity and Related Metabolic Diseases." *Front Nutr* 6:188. doi: 10.3389/fnut.2019.00188.
- Coskun, O., M. Kanter, A. Korkmaz, and S. Oter. 2005. "Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas." *Pharmacol Res* 51 (2):117-23. doi: 10.1016/j.phrs.2004.06.002.
- Crescenzo, R., F. Bianco, I. Falcone, P. Coppola, G. Liverini, and S. Iossa. 2013. "Increased hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose." *Eur J Nutr* 52 (2):537-45. doi: 10.1007/s00394-012-0356-y.
- Czech, M. P. 2017. "Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes." *Nat Med* 23 (7):804-14. doi: 10.1038/nm.4350.
- Dao, T. M., A. Waget, P. Klopp, M. Serino, C. Vachoux, L. Pechere, D. J. Drucker, et al. 2011. "Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control." *PLoS One* 6 (6):e20700. doi: 10.1371/journal.pone.0020700.
- Daud, N. M., N. A. Ismail, E. L. Thomas, J. A. Fitzpatrick, J. D. Bell, J. R. Swann, A. Costabile, et al. 2014. "The impact of oligofructose on stimulation of gut hormones, appetite regulation and adiposity." *Obesity (Silver Spring)* 22 (6):1430-8. doi: 10.1002/oby.20754.

- Davenport, E. R., J. G. Sanders, S. J. Song, K. R. Amato, A. G. Clark, and R. Knight. 2017. "The human microbiome in evolution." *BMC Biol* 15 (1):127. doi: 10.1186/s12915-017-0454-7.
- De Filippo, C., D. Cavalieri, M. Di Paola, M. Ramazzotti, J. B. Poullet, S. Massart, S. Collini, G. Pieraccini, and P. Lionetti. 2010. "Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (33):14691-6. doi: 10.1073/pnas.1005963107.
- de Oliveira Neves, V. G., D. T. de Oliveira, D. C. Oliveira, L. Oliveira Perucci, T. A. P. Dos Santos, I. da Costa Fernandes, G. G. de Sousa, N. R. Barboza, and R. Guerra-Sá. 2020. "High-sugar diet intake, physical activity, and gut microbiota crosstalk: Implications for obesity in rats." *Food Sci Nutr* 8 (10):5683-95. doi: 10.1002/fsn3.1842.
- De Vadder, F., P. Kovatcheva-Datchary, D. Goncalves, J. Vinera, C. Zitoun, A. Duchamp, F. Backhed, and G. Mithieux. 2014. "Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits." *Cell* 156 (1-2):84-96. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.016.
- Deal, B. J., M. D. Huffman, H. Binns, and N. J. Stone. 2020. "Perspective: Childhood Obesity Requires New Strategies for Prevention." *Adv Nutr* 11 (5):1071-8. doi: 10.1093/advances/nmaa040.
- Del Chierico, F., V. Nobili, P. Vernocchi, A. Russo, C. De Stefanis, D. Gnani, C. Furlanello, et al. 2017. "Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach." *Hepatology* 65 (2):451-64. doi: 10.1002/hep.28572.
- Delzenne, N. M., C. Knudsen, M. Beaumont, J. Rodriguez, A. M. Neyrinck, and L. B. Bindels. 2019. "Contribution of the gut microbiota to the regulation of host metabolism and energy balance: a focus on the gut-liver axis." *Proc Nutr Soc* 78 (3):319-28. doi: 10.1017/s0029665118002756.
- den Besten, G., A. Bleeker, A. Gerding, K. van Eunen, R. Havinga, T. H. van Dijk, M. H. Oosterveer, et al. 2015. "Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPARgamma-Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation." *Diabetes* 64 (7):2398-408. doi: 10.2337/db14-1213.
- den Besten, G., K. Lange, R. Havinga, T. H. van Dijk, A. Gerding, K. van Eunen, M. Müller, et al. 2013. "Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305 (12):G900-10. doi: 10.1152/ajpgi.00265.2013.
- den Besten, G., K. van Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D. J. Reijngoud, and B. M. Bakker. 2013. "The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism." *J Lipid Res* 54 (9):2325-40. doi: 10.1194/jlr.R036012.
- Derrien, M., C. Belzer, and W. M. de Vos. 2017. "Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions." *Microb Pathog* 106:171-81. doi: 10.1016/j.micpath.2016.02.005.
- Desai, M. S., A. M. Seekatz, N. M. Koropatkin, N. Kamada, C. A. Hickey, M. Wolter, N. A. Pudlo, et al. 2016. "A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility." *Cell* 167 (5):1339-53.e21. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.043.
- Dickel, Michele Luciane, Stela Maris Kuze Rates, and Mara Rejane Ritter. 2007. "Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil." *Journal of ethnopharmacology* 109 (1):60-71.
- Ding, S., M. M. Chi, B. P. Scull, R. Rigby, N. M. Schwerbrock, S. Magness, C. Jobin, and P. K. Lund. 2010. "High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse." *PLoS One* 5 (8):e12191. doi: 10.1371/journal.pone.0012191.
- Ding, S., and P. K. Lund. 2011. "Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14 (4):328-33. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283478727.
- Ding, Y., Z. Song, H. Li, L. Chang, T. Pan, X. Gu, X. He, and Z. Fan. 2019. "Honokiol Ameliorates High-Fat-Diet-Induced Obesity of Different Sexes of Mice by Modulating the Composition of the Gut Microbiota." *Front Immunol* 10:2800. doi: 10.3389/fimmu.2019.02800.
- Ding, Y., Z. F. Zhang, X. Q. Dai, and Y. Li. 2012. "Myricetin protects against cytokine-induced cell death in RIN-m5f beta cells." *J Med Food* 15 (8):733-40. doi: 10.1089/jmf.2011.2033.



- Do, M. H., E. Lee, M. J. Oh, Y. Kim, and H. Y. Park. 2018. "High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change." *Nutrients* 10 (6). doi: 10.3390/nu10060761.
- Dominguez-Bello, M. G., E. K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, N. Fierer, and R. Knight. 2010. "Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (26):11971-5. doi: 10.1073/pnas.1002601107.
- Dominguez-Bello, M. G., K. M. De Jesus-Laboy, N. Shen, L. M. Cox, A. Amir, A. Gonzalez, N. A. Bokulich, et al. 2016. "Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer." *Nat Med* 22 (3):250-3. doi: 10.1038/nm.4039.
- Drazic, A., L. M. Myklebust, R. Ree, and T. Arnesen. 2016. "The world of protein acetylation." *Biochim Biophys Acta* 1864 (10):1372-401. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.007.
- Duda-Chodak, A., T. Tarko, P. Satora, and P. Sroka. 2015. "Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review." *Eur J Nutr* 54 (3):325-41. doi: 10.1007/s00394-015-0852-y.
- Duenas, M., I. Munoz-Gonzalez, C. Cueva, A. Jimenez-Giron, F. Sanchez-Patan, C. Santos-Buelga, M. V. Moreno-Arribas, and B. Bartolome. 2015. "A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols." *Biomed Res Int* 2015:850902. doi: 10.1155/2015/850902.
- Duncan, S. H., A. Barcenilla, C. S. Stewart, S. E. Pryde, and H. J. Flint. 2002. "Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine." *Appl Environ Microbiol* 68 (10):5186-90. doi: 10.1128/aem.68.10.5186-5190.2002.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman. 2005. "Diversity of the human intestinal microbial flora." *Science* 308 (5728):1635-8. doi: 10.1126/science.1110591.
- Ejtahed, H. S., P. Angoorani, A. R. Soroush, S. Hasani-Ranjbar, S. D. Siadat, and B. Larijani. 2020. "Gut microbiota-derived metabolites in obesity: a systematic review." *Biosci Microbiota Food Health* 39 (3):65-76. doi: 10.12938/bmfh.2019-026.
- Ejtahed, H. S., J. Mohtadi-Nia, A. Homayouni-Rad, M. Niafar, M. Asghari-Jafarabadi, V. Mofid, and A. Akbarian-Moghari. 2011. "Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus." *J Dairy Sci* 94 (7):3288-94. doi: 10.3168/jds.2010-4128.
- Eslamparast, T., P. Tandon, and M. Raman. 2017. "Dietary Composition Independent of Weight Loss in the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Nutrients* 9 (8). doi: 10.3390/nu9080800.
- Esmaili, M. A., F. Zohari, and H. Sadeghi. 2009. "Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucrium polium* on beta-cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes." *Planta Med* 75 (13):1418-20. doi: 10.1055/s-0029-1185704.
- Etxeberria, U., N. Arias, N. Boqué, M. T. Macarulla, M. P. Portillo, J. A. Martínez, and F. I. Milagro. 2015. "Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats." *J Nutr Biochem* 26 (6):651-60. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.01.002.
- Etxeberria, U., E. Hijona, L. Aguirre, F. I. Milagro, L. Bujanda, A. M. Rimando, J. A. Martinez, and M. P. Portillo. 2017. "Pterostilbene-induced changes in gut microbiota composition in relation to obesity." *Mol Nutr Food Res* 61 (1). doi: 10.1002/mnfr.201500906.
- Everard, A., C. Belzer, L. Geurts, J. P. Ouwerkerk, C. Druart, L. B. Bindels, Y. Guiot, et al. 2013. "Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (22):9066-71. doi: 10.1073/pnas.1219451110.
- Everard, A., V. Lazarevic, M. Derrien, M. Girard, G. G. Muccioli, A. M. Neyrinck, S. Possemiers, et al. 2011. "Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice." *Diabetes* 60 (11):2775-86. doi: 10.2337/db11-0227.
- Fajstova, A., N. Galanova, S. Coufal, J. Malkova, M. Kostovcik, M. Cermakova, H. Pelantova, et al. 2020. "Diet Rich in Simple Sugars Promotes Pro-Inflammatory Response via Gut Microbiota Alteration and TLR4 Signaling." *Cells* 9 (12). doi: 10.3390/cells9122701.

- Fandriks, L. 2017. "Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview." *J Intern Med* 281 (4):319-36. doi: 10.1111/joim.12584.
- Farhat, G., S. Drummond, and E. A. S. Al-Dujaili. 2017. "Polyphenols and Their Role in Obesity Management: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials." *Phytother Res* 31 (7):1005-18. doi: 10.1002/ptr.5830.
- Faruque, S., J. Tong, V. Lacmanovic, C. Agbonghae, D. M. Minaya, and K. Czaja. 2019. "The Dose Makes the Poison: Sugar and Obesity in the United States - a Review." *Pol J Food Nutr Sci* 69 (3):219-33. doi: 10.31883/pjfn/110735.
- Fernandes, E. S., L. Liang, S. J. Smillie, F. Kaiser, R. Purcell, D. W. Rivett, S. Alam, et al. 2012. "TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome." *J Immunol* 188 (11):5741-51. doi: 10.4049/jimmunol.1102147.
- Ferre, P., and F. Fougère. 2010. "Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c." *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2:83-92. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x.
- Fidler Mis, N., C. Braegger, J. Bronsky, C. Campoy, M. Domellöf, N. D. Embleton, I. Hojsak, et al. 2017. "Sugar in Infants, Children and Adolescents: A Position Paper of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 65 (6):681-96. doi: 10.1097/mpg.0000000000001733.
- Finicelli, M., T. Squillaro, F. Di Cristo, A. Di Salle, M. A. B. Melone, U. Galderisi, and G. Peluso. 2019. "Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives." *J Cell Physiol* 234 (5):5807-26. doi: 10.1002/jcp.27506.
- Fisberg, M., I. Kovalskys, G. Gómez, A. Rigotti, L. Y. C. Sanabria, M. C. Y. García, R. G. P. Torres, et al. 2018. "Total and Added Sugar Intake: Assessment in Eight Latin American Countries." *Nutrients* 10 (4). doi: 10.3390/nu10040389.
- Flister, K. F. T., B. A. S. Pinto, L. M. França, C. F. F. Coêlho, P. C. Dos Santos, C. C. Vale, D. Kajihara, V. Debbas, F. R. M. Laurindo, and A. M. A. Paes. 2018. "Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice." *J Nutr Biochem* 62:155-66. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.09.007.
- Fraga, C. G., K. D. Croft, D. O. Kennedy, and F. A. Tomas-Barberan. 2019. "The effects of polyphenols and other bioactives on human health." *Food Funct* 10 (2):514-28. doi: 10.1039/c8fo01997e.
- Fraga, C. G., K. D. Croft, D. O. Kennedy, and F. A. Tomás-Barberán. 2019. "The effects of polyphenols and other bioactives on human health." *Food Funct* 10 (2):514-28. doi: 10.1039/c8fo01997e.
- Fraga, C. G., P. I. Oteiza, and M. Galleano. 2018. "Plant bioactives and redox signaling: (-)-Epicatechin as a paradigm." *Mol Aspects Med* 61:31-40. doi: 10.1016/j.mam.2018.01.007.
- Franca, L. M., C. F. F. Coelho, L. N. C. Freitas, I. L. S. Souza, V. T. Chagas, V. Debbas, T. M. de Lima, H. P. de Souza, F. R. M. Laurindo, and A. M. A. Paes. 2019. "Syzygium cumini Leaf Extract Reverts Hypertriglyceridemia via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats." *Oxid Med Cell Longev* 2019:9417498. doi: 10.1155/2019/9417498.
- França, L. M., C. F. F. Coêlho, L. N. C. Freitas, I. L. S. Souza, V. T. Chagas, V. Debbas, T. M. de Lima, H. P. de Souza, F. R. M. Laurindo, and A. M. A. Paes. 2019. "Syzygium cumini Leaf Extract Reverts Hypertriglyceridemia via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats." *Oxid Med Cell Longev* 2019:9417498. doi: 10.1155/2019/9417498.
- Freeland, K. R., and T. M. Wolever. 2010. "Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha." *Br J Nutr* 103 (3):460-6. doi: 10.1017/s0007114509991863.
- Freidenberg, G. R., D. Reichart, J. M. Olefsky, and R. R. Henry. 1988. "Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss." *J Clin Invest* 82 (4):1398-406. doi: 10.1172/jci113744.

- Frias, B., and A. Merighi. 2016. "Capsaicin, Nociception and Pain." *Molecules* 21 (6). doi: 10.3390/molecules21060797.
- Friedman, S. L., B. A. Neuschwander-Tetri, M. Rinella, and A. J. Sanyal. 2018. "Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies." *Nat Med* 24 (7):908-22. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9.
- Frost, G., M. L. Sleeth, M. Sahuri-Arisoylu, B. Lizarbe, S. Cerdan, L. Brody, J. Anastasovska, et al. 2014. "The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism." *Nat Commun* 5:3611. doi: 10.1038/ncomms4611.
- Fuke, N., N. Nagata, H. Suganuma, and T. Ota. 2019. "Regulation of Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia with Dietary Factors." *Nutrients* 11 (10). doi: 10.3390/nu11102277.
- Furet, J. P., L. C. Kong, J. Tap, C. Poitou, A. Basdevant, J. L. Bouillot, D. Mariat, et al. 2010. "Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers." *Diabetes* 59 (12):3049-57. doi: 10.2337/db10-0253.
- Gandhi, G. R., P. Vanlalhruaia, A. Stalin, S. S. Irudayaraj, S. Ignacimuthu, and M. G. Paulraj. 2014. "Polyphenols-rich *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. beans show hypoglycemic and beta-cells protective effects in type 2 diabetic rats." *Food Chem Toxicol* 66:358-65. doi: 10.1016/j.fct.2014.02.001.
- Gao, Z., J. Yin, J. Zhang, R. E. Ward, R. J. Martin, M. Lefevre, W. T. Cefalu, and J. Ye. 2009. "Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice." *Diabetes* 58 (7):1509-17. doi: 10.2337/db08-1637.
- Gibson, G. R., R. Hutkins, M. E. Sanders, S. L. Prescott, R. A. Reimer, S. J. Salminen, K. Scott, et al. 2017. "Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14 (8):491-502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gill, P. A., M. C. van Zelm, J. G. Muir, and P. R. Gibson. 2018. "Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders." *Aliment Pharmacol Ther* 48 (1):15-34. doi: 10.1111/apt.14689.
- Gill, S. R., M. Pop, R. T. Deboy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett, and K. E. Nelson. 2006. "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome." *Science* 312 (5778):1355-9. doi: 10.1126/science.1124234.
- Giugliano, D., M. I. Maiorino, G. Bellastella, and K. Esposito. 2018. "More sugar? No, thank you! The elusive nature of low carbohydrate diets." *Endocrine* 61 (3):383-7. doi: 10.1007/s12020-018-1580-x.
- "Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." 2015. *Lancet* 385 (9963):117-71. doi: 10.1016/s0140-6736(14)61682-2.
- Grundey, S. M. 2008. "Metabolic syndrome pandemic." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (4):629-36. doi: 10.1161/atvbaha.107.151092.
- Guerrero-Romero, F., L. E. Simental-Mendía, M. González-Ortiz, E. Martínez-Abundis, M. G. Ramos-Zavala, S. O. Hernández-González, O. Jacques-Camarena, and M. Rodríguez-Morán. 2010. "The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp." *J Clin Endocrinol Metab* 95 (7):3347-51. doi: 10.1210/jc.2010-0288.
- Gupta, A. P., P. Singh, R. Garg, G. R. Valicherla, M. Riyazuddin, A. A. Syed, Z. Hossain, and J. R. Gayen. 2019. "Pancreastatin inhibitor activates AMPK pathway via GRP78 and ameliorates dexamethasone induced fatty liver disease in C57BL/6 mice." *Biomed Pharmacother* 116:108959. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108959.
- Gwiazdowska, D., K. Juś, J. Jasnowska-Małecka, and K. Kluczyńska. 2015. "The impact of polyphenols on *Bifidobacterium* growth." *Acta Biochim Pol* 62 (4):895-901. doi: 10.18388/abp.2015\_1154.
- Halberg, N., I. Wernstedt-Asterholm, and P. E. Scherer. 2008. "The adipocyte as an endocrine cell." *Endocrinol Metab Clin North Am* 37 (3):753-68, x-xi. doi: 10.1016/j.ecl.2008.07.002.
- Hannou, S. A., D. E. Haslam, N. M. McKeown, and M. A. Herman. 2018. "Fructose metabolism and metabolic disease." *J Clin Invest* 128 (2):545-55. doi: 10.1172/jci96702.

- Hassid, WZ, and S Abraham. 1957. "[7] Chemical procedures for analysis of polysaccharides." *Anal Chem* 29(12):1845-1848. doi: 10.1021/ed2b017a017.
- Hawkesworth, S., S. E. Moore, A. J. Fulford, G. R. Barclay, A. A. Darboe, H. Mark, O. A. Nyan, and A. M. Prentice. 2013. "Evidence for metabolic endotoxemia in obese and diabetic Gambian women." *Nutr Diabetes* 3:e83. doi: 10.1038/nutd.2013.24.
- Helmstädter, A. 2008. "Syzygium cumini (L.) SKEELS (Myrtaceae) against diabetes--125 years of research." *Pharmazie* 63 (2):91-101.
- Henning, S. M., J. Yang, M. Hsu, R. P. Lee, E. M. Grojean, A. Ly, C. H. Tseng, D. Heber, and Z. Li. 2018. "Decaffeinated green and black tea polyphenols decrease weight gain and alter microbiome populations and function in diet-induced obese mice." *Eur J Nutr* 57 (8):2759-69. doi: 10.1007/s00394-017-1542-8.
- Heras-Gonzalez, L., J. A. Latorre, M. Martinez-Bebia, N. Gimenez-Blasi, F. Olea-Serrano, and M. Mariscal-Arcas. 2020. "Sugar consumption in schoolchildren from southern Spain and influence on the prevalence of obesity." *PLoS One* 15 (11):e0242602. doi: 10.1371/journal.pone.0242602.
- Hetz, C., E. Chevet, and S. A. Oakes. 2015. "Proteostasis control by the unfolded protein response." *Nat Cell Biol* 17 (7):829-38. doi: 10.1038/ncb3184.
- Heymsfield, S. B., and T. A. Wadden. 2017a. "Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity." *N Engl J Med* 376 (15):1492. doi: 10.1056/NEJMc1701944.
- . 2017b. "Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity." *N Engl J Med* 376 (3):254-66. doi: 10.1056/NEJMra1514009.
- Hill, C., F. Guarner, G. Reid, G. R. Gibson, D. J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, et al. 2014. "Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11 (8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
- Horton, F., J. Wright, L. Smith, P. J. Hinton, and M. D. Robertson. 2014. "Increased intestinal permeability to oral chromium (51 Cr) -EDTA in human Type 2 diabetes." *Diabet Med* 31 (5):559-63. doi: 10.1111/dme.12360.
- Hsieh, F. C., C. L. Lee, C. Y. Chai, W. T. Chen, Y. C. Lu, and C. S. Wu. 2013. "Oral administration of Lactobacillus reuteri GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats." *Nutr Metab (Lond)* 10 (1):35. doi: 10.1186/1743-7075-10-35.
- Hu, Jiamiao, Shaoling Lin, Baodong Zheng, and Peter CK Cheung. 2018. "Short-chain fatty acids in control of energy metabolism." *Critical reviews in food science and nutrition* 58 (8):1243-9.
- Hui, S., Y. Liu, M. Chen, X. Wang, H. Lang, M. Zhou, L. Yi, and M. Mi. 2019. "Capsaicin Improves Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity Through Modulation of the Gut Microbiota-Bile Acid-FXR Axis in Type 2 Diabetic db/db Mice." *Mol Nutr Food Res* 63 (23):e1900608. doi: 10.1002/mnfr.201900608.
- Human Microbiome Project, Consortium. 2012. "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." *Nature* 486 (7402):207-14. doi: 10.1038/nature11234.
- Ikarashi, N., S. Ogawa, R. Hirobe, R. Kon, Y. Kusunoki, M. Yamashita, N. Mizukami, et al. 2017. "Epigallocatechin gallate induces a hepatospecific decrease in the CYP3A expression level by altering intestinal flora." *Eur J Pharm Sci* 100:211-8. doi: 10.1016/j.ejps.2017.01.022.
- Jayakumar, S., and R. Loomba. 2019. "Review article: emerging role of the gut microbiome in the progression of nonalcoholic fatty liver disease and potential therapeutic implications." *Aliment Pharmacol Ther* 50 (2):144-58. doi: 10.1111/apt.15314.
- Jimenez, E., M. L. Marin, R. Martin, J. M. Odriozola, M. Olivares, J. Xaus, L. Fernandez, and J. M. Rodriguez. 2008. "Is meconium from healthy newborns actually sterile?" *Res Microbiol* 159 (3):187-93. doi: 10.1016/j.resmic.2007.12.007.
- Jin, J. S., M. Touyama, T. Hisada, and Y. Benno. 2012. "Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to Bifidobacterium species." *Microbiol Immunol* 56 (11):729-39. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00502.x.
- Jocken, J. W. E., M. A. Gonzalez Hernandez, N. T. H. Hoebers, C. M. van der Beek, Y. P. G. Essers, E. E. Blaak, and E. E. Canfora. 2017. "Short-Chain Fatty Acids Differentially Affect Intracellular Lipolysis in a Human White Adipocyte Model." *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:372. doi: 10.3389/fendo.2017.00372.

- Johnson, R. J., L. G. Sánchez-Lozada, P. Andrews, and M. A. Lanaspa. 2017. "Perspective: A Historical and Scientific Perspective of Sugar and Its Relation with Obesity and Diabetes." *Adv Nutr* 8 (3):412-22. doi: 10.3945/an.116.014654.
- Jung, M. J., J. Lee, N. R. Shin, M. S. Kim, D. W. Hyun, J. H. Yun, P. S. Kim, T. W. Whon, and J. W. Bae. 2016. "Chronic Repression of mTOR Complex 2 Induces Changes in the Gut Microbiota of Diet-induced Obese Mice." *Sci Rep* 6:30887. doi: 10.1038/srep30887.
- Kammoun, H. L., H. Chabanon, I. Hainault, S. Luquet, C. Magnan, T. Koike, P. Ferre, and F. Foufelle. 2009. "GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice." *J Clin Invest* 119 (5):1201-15. doi: 10.1172/jci37007.
- Kang, C., B. Wang, K. Kaliannan, X. Wang, H. Lang, S. Hui, L. Huang, et al. 2017. "Gut Microbiota Mediates the Protective Effects of Dietary Capsaicin against Chronic Low-Grade Inflammation and Associated Obesity Induced by High-Fat Diet." *MBio* 8 (3). doi: 10.1128/mBio.00470-17.
- Kang, C., Y. Zhang, X. Zhu, K. Liu, X. Wang, M. Chen, J. Wang, et al. 2016. "Healthy Subjects Differentially Respond to Dietary Capsaicin Correlating with Specific Gut Enterotypes." *J Clin Endocrinol Metab* 101 (12):4681-9. doi: 10.1210/jc.2016-2786.
- Kannan, M. M., and S. D. Quine. 2013. "Ellagic acid inhibits cardiac arrhythmias, hypertrophy and hyperlipidaemia during myocardial infarction in rats." *Metabolism* 62 (1):52-61. doi: 10.1016/j.metabol.2012.06.003.
- Kasai, C., K. Sugimoto, I. Moritani, J. Tanaka, Y. Oya, H. Inoue, M. Tameda, et al. 2015. "Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing." *BMC Gastroenterol* 15:100. doi: 10.1186/s12876-015-0330-2.
- Keylor, M. H., B. S. Matsuura, and C. R. Stephenson. 2015. "Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products." *Chem Rev* 115 (17):8976-9027. doi: 10.1021/cr500689b.
- Khan, S., S. Waliullah, V. Godfrey, M. A. W. Khan, R. A. Ramachandran, B. L. Cantarel, C. Behrendt, L. Peng, L. V. Hooper, and H. Zaki. 2020. "Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice." *Sci Transl Med* 12 (567). doi: 10.1126/scitranslmed.aay6218.
- Kim, H. S., M. J. Quon, and J. A. Kim. 2014. "New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate." *Redox Biol* 2:187-95. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.022.
- Kim, S. C., R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, et al. 2006. "Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey." *Mol Cell* 23 (4):607-18. doi: 10.1016/j.molcel.2006.06.026.
- Kim, S. W., K. Y. Park, B. Kim, E. Kim, and C. K. Hyun. 2013. "Lactobacillus rhamnosus GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production." *Biochem Biophys Res Commun* 431 (2):258-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.121.
- Kitade, H., G. Chen, Y. Ni, and T. Ota. 2017. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments." *Nutrients* 9 (4). doi: 10.3390/nu9040387.
- Kleiner, David E, Elizabeth M Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J Contos, Oscar W Cummings, Linda D Ferrell, Yao-Chang Liu, Michael S Torbenson, and Aynur Unalp-Arida. 2005. "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 41 (6):1313-21.
- Koh, A., F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, and F. Backhed. 2016. "From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites." *Cell* 165 (6):1332-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
- Koh, A., F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, and F. Bäckhed. 2016. "From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites." *Cell* 165 (6):1332-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
- Krautkramer, K. A., J. H. Kreznar, K. A. Romano, E. I. Vivas, G. A. Barrett-Wilt, M. E. Rabaglia, M. P. Keller, A. D. Attie, F. E. Rey, and J. M. Denu. 2016. "Diet-Microbiota Interactions Mediate

- Global Epigenetic Programming in Multiple Host Tissues." *Mol Cell* 64 (5):982-92. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.025.
- Kumar, A, R Ilavarasan, T Jayach, M Deecaraman, P Aravindan, N Padmanabhan, and MRV Krishan. 2013. "Anti-diabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats." *Journal of Medicinal Plants Research* 2 (9):246-9.
- Kumar, A, R Ilavarasan, T Jayachandran, M Deecaraman, P Aravindan, N Padmanabhan, and MRV Krishan. 2008. "Anti-diabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats." *Journal of Medicinal Plants Research* 2 (9):246-9.
- Kumarappan, C. T., E. Thilagam, M. Vijayakumar, and S. C. Mandal. 2012. "Modulatory effect of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens* on oxidative stress in rats with experimentally induced diabetes." *Indian J Med Res* 136 (5):815-21.
- Kundu, P., E. Blacher, E. Elinav, and S. Pettersson. 2017. "Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self." *Cell* 171 (7):1481-93. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.024.
- Kuwahara, A. 2014. "Contributions of colonic short-chain Fatty Acid receptors in energy homeostasis." *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:144. doi: 10.3389/fendo.2014.00144.
- Laffin, M., R. Fedorak, A. Zalasky, H. Park, A. Gill, A. Agrawal, A. Keshteli, N. Hotte, and K. L. Madsen. 2019. "A high-sugar diet rapidly enhances susceptibility to colitis via depletion of luminal short-chain fatty acids in mice." *Sci Rep* 9 (1):12294. doi: 10.1038/s41598-019-48749-2.
- Lam, Y. Y., C. W. Ha, C. R. Campbell, A. J. Mitchell, A. Dinudom, J. Oscarsson, D. I. Cook, et al. 2012. "Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice." *PLoS One* 7 (3):e34233. doi: 10.1371/journal.pone.0034233.
- Larraufie, P., C. Martin-Gallausiaux, N. Lapaque, J. Dore, F. M. Gribble, F. Reimann, and H. M. Blottiere. 2018. "SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells." *Sci Rep* 8 (1):74. doi: 10.1038/s41598-017-18259-0.
- Larrosa, M., M. J. Yanez-Gascon, M. V. Selma, A. Gonzalez-Sarrias, S. Toti, J. J. Ceron, F. Tomas-Barberan, P. Dolara, and J. C. Espin. 2009. "Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model." *J Agric Food Chem* 57 (6):2211-20. doi: 10.1021/jf803638d.
- Larsen, N., F. K. Vogensen, F. W. van den Berg, D. S. Nielsen, A. S. Andreasen, B. K. Pedersen, W. A. Al-Soud, S. J. Sørensen, L. H. Hansen, and M. Jakobsen. 2010. "Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults." *PLoS One* 5 (2):e9085. doi: 10.1371/journal.pone.0009085.
- Le Roy, T., M. Llopis, P. Lepage, A. Bruneau, S. Rabot, C. Bevilacqua, P. Martin, et al. 2013. "Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice." *Gut* 62 (12):1787-94. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303816.
- Lee, S., K. I. Keirse, R. Kirkland, Z. I. Grunewald, J. G. Fischer, and C. B. de La Serre. 2018. "Blueberry Supplementation Influences the Gut Microbiota, Inflammation, and Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Rats." *J Nutr* 148 (2):209-19. doi: 10.1093/jn/nxx027.
- Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon. 2005. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.
- Ley, R. E., F. Bäckhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon. 2005. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.
- Ley, R. E., C. A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight, and J. I. Gordon. 2008. "Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota." *Nat Rev Microbiol* 6 (10):776-88. doi: 10.1038/nrmicro1978.
- Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, S. Klein, and J. I. Gordon. 2006. "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." *Nature* 444 (7122):1022-3. doi: 10.1038/4441022a.
- Li, X., K. Watanabe, and I. Kimura. 2017. "Gut Microbiota Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases." *Front Immunol* 8:1882. doi: 10.3389/fimmu.2017.01882.

- Li, X., J. Yin, Y. Zhu, X. Wang, X. Hu, W. Bao, Y. Huang, et al. 2018. "Effects of Whole Milk Supplementation on Gut Microbiota and Cardiometabolic Biomarkers in Subjects with and without Lactose Malabsorption." *Nutrients* 10 (10). doi: 10.3390/nu10101403.
- Li, Y., J. Li, Q. Su, and Y. Liu. 2019. "Sinapine reduces non-alcoholic fatty liver disease in mice by modulating the composition of the gut microbiota." *Food Funct* 10 (6):3637-49. doi: 10.1039/c9fo00195f.
- Liao, C. C., T. T. Ou, C. H. Wu, and C. J. Wang. 2013. "Prevention of diet-induced hyperlipidemia and obesity by caffeic acid in C57BL/6 mice through regulation of hepatic lipogenesis gene expression." *J Agric Food Chem* 61 (46):11082-8. doi: 10.1021/jf4026647.
- Liao, W., X. Yin, Q. Li, H. Zhang, Z. Liu, X. Zheng, L. Zheng, and X. Feng. 2018. "Resveratrol-Induced White Adipose Tissue Browning in Obese Mice by Remodeling Fecal Microbiota." *Molecules* 23 (12). doi: 10.3390/molecules23123356.
- Lim, S. S., T. Vos, A. D. Flaxman, G. Danaei, K. Shibuya, H. Adair-Rohani, M. Amann, et al. 2012. "A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet* 380 (9859):2224-60. doi: 10.1016/s0140-6736(12)61766-8.
- Lin, H. V., A. Frassetto, E. J. Kowalik, Jr., A. R. Nawrocki, M. M. Lu, J. R. Kosinski, J. A. Hubert, et al. 2012. "Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms." *PLoS One* 7 (4):e35240. doi: 10.1371/journal.pone.0035240.
- Lin, S., Z. Wang, K. L. Lam, S. Zeng, B. K. Tan, and J. Hu. 2019. "Role of intestinal microecology in the regulation of energy metabolism by dietary polyphenols and their metabolites." *Food Nutr Res* 63. doi: 10.29219/fnr.v63.1518.
- Liu, I. M., S. S. Liou, T. W. Lan, F. L. Hsu, and J. T. Cheng. 2005. "Myricetin as the active principle of *Abelmoschus moschatus* to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats." *Planta Med* 71 (7):617-21. doi: 10.1055/s-2005-871266.
- Liu, I. M., T. F. Tzeng, S. S. Liou, and T. W. Lan. 2007. "Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats." *Life Sci* 81 (21-22):1479-88. doi: 10.1016/j.lfs.2007.08.045.
- Liu, X., S. Cao, and X. Zhang. 2015. "Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet." *J Agric Food Chem* 63 (36):7885-95. doi: 10.1021/acs.jafc.5b02404.
- Liu, Z., N. Wang, Y. Ma, and D. Wen. 2019. "Hydroxytyrosol Improves Obesity and Insulin Resistance by Modulating Gut Microbiota in High-Fat Diet-Induced Obese Mice." *Front Microbiol* 10:390. doi: 10.3389/fmicb.2019.00390.
- Lloyd-Price, J., G. Abu-Ali, and C. Huttenhower. 2016. "The healthy human microbiome." *Genome Med* 8 (1):51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y.
- Loomba, R., V. Seguritan, W. Li, T. Long, N. Klitgord, A. Bhatt, P. S. Dulai, et al. 2019. "Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Cell Metab* 30 (3):607. doi: 10.1016/j.cmet.2019.08.002.
- Louis, P., and H. J. Flint. 2009. "Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine." *FEMS Microbiol Lett* 294 (1):1-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x.
- Louis, P., G. L. Hold, and H. J. Flint. 2014. "The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer." *Nat Rev Microbiol* 12 (10):661-72. doi: 10.1038/nrmicro3344.
- Louis, P., K. P. Scott, S. H. Duncan, and H. J. Flint. 2007. "Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine." *J Appl Microbiol* 102 (5):1197-208. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03322.x.
- Lozupone, C. A., J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, and R. Knight. 2012. "Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota." *Nature* 489 (7415):220-30. doi: 10.1038/nature11550.
- Lu, Y., C. Fan, P. Li, Y. Lu, X. Chang, and K. Qi. 2016. "Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Protein-coupled Receptors and Gut Microbiota." *Sci Rep* 6:37589. doi: 10.1038/srep37589.

- Luca, S. V., I. Macovei, A. Bujor, A. Miron, K. Skalicka-Wozniak, A. C. Aprotosoae, and A. Trifan. 2019. "Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites." *Crit Rev Food Sci Nutr*:1-34. doi: 10.1080/10408398.2018.1546669.
- Luoto, R., K. Laitinen, M. Nermes, and E. Isolauri. 2010. "Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study." *Br J Nutr* 103 (12):1792-9. doi: 10.1017/s0007114509993898.
- Macchione, I. G., L. R. Lopetuso, G. Ianiro, M. Napoli, G. Gibiino, G. Rizzatti, V. Petito, A. Gasbarrini, and F. Scaldaferrì. 2019. "Akkermansia muciniphila: key player in metabolic and gastrointestinal disorders." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23 (18):8075-83. doi: 10.26355/eurrev\_201909\_19024.
- Mahowald, M. A., F. E. Rey, H. Seedorf, P. J. Turnbaugh, R. S. Fulton, A. Wollam, N. Shah, et al. 2009. "Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (14):5859-64. doi: 10.1073/pnas.0901529106.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Remesy. 2005. "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." *Am J Clin Nutr* 81 (1 Suppl):230S-42S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.230S.
- Marra, F., and G. Svegliati-Baroni. 2018. "Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis." *J Hepatol* 68 (2):280-95. doi: 10.1016/j.jhep.2017.11.014.
- Martin, Marcel. 2011. "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads." *EMBnet. journal* 17 (1):10-2.
- Martinez, K. B., J. F. Pierre, and E. B. Chang. 2016. "The Gut Microbiota: The Gateway to Improved Metabolism." *Gastroenterol Clin North Am* 45 (4):601-14. doi: 10.1016/j.gtc.2016.07.001.
- Masella, Andre P, Andrea K Bartram, Jakub M Truszkowski, Daniel G Brown, and Josh D Neufeld. 2012. "PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences." *BMC bioinformatics* 13 (1):31.
- Mastan, SK, G Chaitanya, T Bhavya Latha, A Srikanth, G Sumalatha, and K Eswar Kumar. 2009. "Cardioprotective effect of methanolic extract of Syzygium cumini seeds on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats." *Der Pharmacia Lettre* 1 (1):143-9.
- Masumoto, S., A. Terao, Y. Yamamoto, T. Mukai, T. Miura, and T. Shoji. 2016. "Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes." *Sci Rep* 6:31208. doi: 10.1038/srep31208.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner. 1985. "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." *Diabetologia* 28 (7):412-9. doi: 10.1007/bf00280883.
- McCracken, E., M. Monaghan, and S. Sreenivasan. 2018. "Pathophysiology of the metabolic syndrome." *Clin Dermatol* 36 (1):14-20. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.004.
- McFall-Ngai, M., M. G. Hadfield, T. C. Bosch, H. V. Carey, T. Domazet-Lošo, A. E. Douglas, N. Dubilier, et al. 2013. "Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (9):3229-36. doi: 10.1073/pnas.1218525110.
- Menzies, K. J., H. Zhang, E. Katsyuba, and J. Auwerx. 2016. "Protein acetylation in metabolism - metabolites and cofactors." *Nat Rev Endocrinol* 12 (1):43-60. doi: 10.1038/nrendo.2015.181.
- Meyer, J. G., S. Softic, N. Basisty, M. J. Rardin, E. Verdin, B. W. Gibson, O. Ilkayeva, C. B. Newgard, C. R. Kahn, and B. Schilling. 2018. "Temporal dynamics of liver mitochondrial protein acetylation and succinylation and metabolites due to high fat diet and/or excess glucose or fructose." *PLoS One* 13 (12):e0208973. doi: 10.1371/journal.pone.0208973.
- Miller, J. M., M. B. Kaylor, M. Johannsson, C. Bay, and J. R. Churilla. 2014. "Prevalence of metabolic syndrome and individual criterion in US adolescents: 2001-2010 National Health and Nutrition Examination Survey." *Metab Syndr Relat Disord* 12 (10):527-32. doi: 10.1089/met.2014.0055.
- Miller, T. L., and M. J. Wolin. 1996. "Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora." *Appl Environ Microbiol* 62 (5):1589-92.



- Milligan, Graeme, Leigh A. Stoddart, and Nicola J. Smith. 2009. "Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3." *British Journal of Pharmacology* 158 (1):146-53. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00421.x.
- Moon, J., H. J. Do, O. Y. Kim, and M. J. Shin. 2013. "Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats." *Food Chem Toxicol* 58:347-54. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.006.
- Moore, J. B. 2019. "From sugar to liver fat and public health: systems biology driven studies in understanding non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis." *Proc Nutr Soc*:1-15. doi: 10.1017/s0029665119000570.
- Moran-Ramos, S., A. Avila-Nava, A. R. Tovar, J. Pedraza-Chaverri, P. Lopez-Romero, and N. Torres. 2012. "Opuntia ficus indica (nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese Zucker (fa/fa) rats." *J Nutr* 142 (11):1956-63. doi: 10.3945/jn.112.165563.
- Moreira, A. P., T. F. Teixeira, A. B. Ferreira, C. Peluzio Mdo, and C. Alfenas Rde. 2012. "Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia." *Br J Nutr* 108 (5):801-9. doi: 10.1017/s0007114512001213.
- Moreno-Indias, I., L. Sanchez-Alcoholado, P. Perez-Martinez, C. Andres-Lacueva, F. Cardona, F. Tinahones, and M. I. Queipo-Ortuno. 2016. "Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients." *Food Funct* 7 (4):1775-87. doi: 10.1039/c5fo00886g.
- Moreno-Indias, I., L. Sánchez-Alcoholado, P. Pérez-Martínez, C. Andrés-Lacueva, F. Cardona, F. Tinahones, and M. I. Queipo-Ortuño. 2016. "Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients." *Food Funct* 7 (4):1775-87. doi: 10.1039/c5fo00886g.
- Morrison, D. J., and T. Preston. 2016. "Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism." *Gut Microbes* 7 (3):189-200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
- Most, J., J. Penders, M. Lucchesi, G. H. Goossens, and E. E. Blaak. 2017. "Gut microbiota composition in relation to the metabolic response to 12-week combined polyphenol supplementation in overweight men and women." *Eur J Clin Nutr* 71 (9):1040-5. doi: 10.1038/ejcn.2017.89.
- Murota, K., Y. Nakamura, and M. Uehara. 2018. "Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota." *Biosci Biotechnol Biochem* 82 (4):600-10. doi: 10.1080/09168451.2018.1444467.
- Neal, M. D., C. Leaphart, R. Levy, J. Prince, T. R. Billiar, S. Watkins, J. Li, et al. 2006. "Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier." *J Immunol* 176 (5):3070-9. doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3070.
- Newens, K. J., and J. Walton. 2016. "A review of sugar consumption from nationally representative dietary surveys across the world." *J Hum Nutr Diet* 29 (2):225-40. doi: 10.1111/jhn.12338.
- Neyrinck, A. M., V. F. Van Hée, L. B. Bindels, F. De Backer, P. D. Cani, and N. M. Delzenne. 2013. "Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota." *Br J Nutr* 109 (5):802-9. doi: 10.1017/s0007114512002206.
- Nolan, P. B., G. Carrick-Ranson, J. W. Stinear, S. A. Reading, and L. C. Dalleck. 2017. "Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis." *Prev Med Rep* 7:211-5. doi: 10.1016/j.pmedr.2017.07.004.
- Nordestgaard, B. G., and A. Varbo. 2014. "Triglycerides and cardiovascular disease." *Lancet* 384 (9943):626-35. doi: 10.1016/s0140-6736(14)61177-6.
- O'Neill, S., and L. O'Driscoll. 2015. "Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies." *Obes Rev* 16 (1):1-12. doi: 10.1111/obr.12229.
- Oh, K. J., S. E. Lee, H. Jung, G. Kim, R. Romero, and B. H. Yoon. 2010. "Detection of ureaplasmas by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with cervical insufficiency." *J Perinat Med* 38 (3):261-8. doi: 10.1515/jpm.2010.040.
- Ong, K. C., and H. E. Khoo. 2000. "Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats." *Life Sci* 67 (14):1695-705. doi: 10.1016/s0024-3205(00)00758-x.

- Org, E., Y. Blum, S. Kasela, M. Mehrabian, J. Kuusisto, A. J. Kangas, P. Soininen, et al. 2017. "Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort." *Genome Biol* 18 (1):70. doi: 10.1186/s13059-017-1194-2.
- Organization, World Health. 2015. *Guideline: sugars intake for adults and children*: World Health Organization.
- Otero, Ana Isabel Sañudo, Raquel Criado García, Alba Rodríguez Nogales, Alberto Garach Domech, Mónica Olivares Martín, Julio Juan Gálvez Peralta, Santiago De La Escalera Huerso, Juan Manuel Duarte Pérez, Antonio Zarzuelo Zurita, and Óscar Bañuelos Hortigüela. 2017. "Probiotic strains having cholesterol absorbing capacity, methods and uses thereof." In.: Google Patents.
- Ozato, N., S. Saito, T. Yamaguchi, M. Katashima, I. Tokuda, K. Sawada, Y. Katsuragi, et al. 2019. "Blautia genus associated with visceral fat accumulation in adults 20-76 years of age." *NPJ Biofilms Microbiomes* 5 (1):28. doi: 10.1038/s41522-019-0101-x.
- Ozidal, T., D. A. Sela, J. Xiao, D. Boyacioglu, F. Chen, and E. Capanoglu. 2016. "The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility." *Nutrients* 8 (2):78. doi: 10.3390/nu8020078.
- Pascale, A., N. Marchesi, S. Govoni, A. Coppola, and C. Gazzaruso. 2019. "The role of gut microbiota in obesity, diabetes mellitus, and effect of metformin: new insights into old diseases." *Curr Opin Pharmacol* 49:1-5. doi: 10.1016/j.coph.2019.03.011.
- Patcharatrakul, T., and S. Gonlachanvit. 2016. "Chili Peppers, Curcumins, and Prebiotics in Gastrointestinal Health and Disease." *Curr Gastroenterol Rep* 18 (4):19. doi: 10.1007/s11894-016-0494-0.
- Patel, S. S., R. S. Shah, and R. K. Goyal. 2009. "Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of Dihar, a polyherbal ayurvedic formulation in streptozotocin induced diabetic rats." *Indian J Exp Biol* 47 (7):564-70.
- Paun, A., C. Yau, and J. S. Danska. 2017. "The Influence of the Microbiome on Type 1 Diabetes." *J Immunol* 198 (2):590-5. doi: 10.4049/jimmunol.1601519.
- Perdomo, C. M., G. Fruhbeck, and J. Escalada. 2019. "Impact of Nutritional Changes on Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Nutrients* 11 (3). doi: 10.3390/nu11030677.
- Perry, R. J., L. Peng, N. A. Barry, G. W. Cline, D. Zhang, R. L. Cardone, K. F. Petersen, R. G. Kibbey, A. L. Goodman, and G. I. Shulman. 2016. "Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome." *Nature* 534 (7606):213-7. doi: 10.1038/nature18309.
- Petersen, M. C., and G. I. Shulman. 2018. "Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance." *Physiol Rev* 98 (4):2133-223. doi: 10.1152/physrev.00063.2017.
- Petersen, M. C., D. F. Vatner, and G. I. Shulman. 2017. "Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease." *Nat Rev Endocrinol* 13 (10):572-87. doi: 10.1038/nrendo.2017.80.
- Pinto, B. A., T. M. Melo, K. F. Flister, L. M. Franca, D. Kajihara, L. Y. Tanaka, F. R. Laurindo, and A. M. Paes. 2016. "Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats." *Metab Brain Dis* 31 (4):917-27. doi: 10.1007/s11011-016-9830-1.
- Pinto, B. A., T. M. Melo, K. F. Flister, L. M. França, D. Kajihara, L. Y. Tanaka, F. R. Laurindo, and A. M. Paes. 2016. "Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats." *Metab Brain Dis* 31 (4):917-27. doi: 10.1007/s11011-016-9830-1.
- Porras, D., E. Nistal, S. Martinez-Florez, S. Pisonero-Vaquero, J. L. Olcoz, R. Jover, J. Gonzalez-Gallego, M. V. Garcia-Mediavilla, and S. Sanchez-Campos. 2017. "Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation." *Free Radic Biol Med* 102:188-202. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.037.
- Prajapati, B., P. Rajput, P. K. Jena, and S. Seshadri. 2015. "Investigation of Chitosan for Prevention of Diabetic Progression Through Gut Microbiota Alteration in Sugar Rich Diet Induced Diabetic Rats." *Curr Pharm Biotechnol* 17 (2):173-84. doi: 10.2174/1389201017666151029110505.
- Priyadarshini, Medha, Barton Wicksteed, Gary E Schiltz, Annette Gilchrist, and Brian T Layden. 2016. "SCFA receptors in pancreatic  $\beta$  cells: novel diabetes targets?" *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27 (9):653-64.

- Psichas, A., M. L. Sleeth, K. G. Murphy, L. Brooks, G. A. Bewick, A. C. Hanyaloglu, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, and G. Frost. 2015. "The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents." *Int J Obes (Lond)* 39 (3):424-9. doi: 10.1038/ijo.2014.153.
- Pussinen, P. J., A. S. Havulinna, M. Lehto, J. Sundvall, and V. Salomaa. 2011. "Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes." *Diabetes Care* 34 (2):392-7. doi: 10.2337/dc10-1676.
- Qiao, Y., J. Sun, S. Xia, X. Tang, Y. Shi, and G. Le. 2014. "Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity." *Food Funct* 5 (6):1241-9. doi: 10.1039/c3fo60630a.
- Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, et al. 2010. "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." *Nature* 464 (7285):59-65. doi: 10.1038/nature08821.
- Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, et al. 2010. "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." *Nature* 464 (7285):59-65. doi: 10.1038/nature08821.
- Qin, J., Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang, S. Liang, et al. 2012. "A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes." *Nature* 490 (7418):55-60. doi: 10.1038/nature11450.
- Queipo-Ortuño, M. I., M. Boto-Ordóñez, M. Murri, J. M. Gomez-Zumaquero, M. Clemente-Postigo, R. Estruch, F. Cardona Diaz, C. Andrés-Lacueva, and F. J. Tinahones. 2012. "Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers." *Am J Clin Nutr* 95 (6):1323-34. doi: 10.3945/ajcn.111.027847.
- Rafacho, A., L. P. Roma, S. R. Taboga, A. C. Boscherio, and J. R. Bosqueiro. 2007. "Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets." *Can J Physiol Pharmacol* 85 (5):536-45. doi: 10.1139/y07-037.
- Rafiei, H., K. Omidian, and B. Bandy. 2019. "Dietary Polyphenols Protect Against Oleic Acid-Induced Steatosis in an in Vitro Model of NAFLD by Modulating Lipid Metabolism and Improving Mitochondrial Function." *Nutrients* 11 (3). doi: 10.3390/nu11030541.
- Ragsdale, S. W., and E. Pierce. 2008. "Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO(2) fixation." *Biochim Biophys Acta* 1784 (12):1873-98. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.08.012.
- Rahat-Rozenbloom, S., J. Fernandes, G. B. Gloor, and T. M. Wolever. 2014. "Evidence for greater production of colonic short-chain fatty acids in overweight than lean humans." *Int J Obes (Lond)* 38 (12):1525-31. doi: 10.1038/ijo.2014.46.
- Raman, M., I. Ahmed, P. M. Gillevet, C. S. Probert, N. M. Ratcliffe, S. Smith, R. Greenwood, et al. 2013. "Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease." *Clin Gastroenterol Hepatol* 11 (7):868-75.e1-3. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.015.
- Rameshrad, M., B. M. Razavi, M. Imenshahidi, and H. Hosseinzadeh. 2019. "Vitis vinifera (grape) seed extract and resveratrol alleviate bisphenol-A-induced metabolic syndrome: Biochemical and molecular evidences." *Phytother Res* 33 (3):832-44. doi: 10.1002/ptr.6276.
- Ramya, S., K. Neethirajan, and R. Jayakumararaj. 2012. "Profile of bioactive compounds in Syzygium cumini—a review." *J. Pharm. Res* 5 (8):4548-53.
- Rastelli, M., C. Knauf, and P. D. Cani. 2018. "Gut Microbes and Health: A Focus on the Mechanisms Linking Microbes, Obesity, and Related Disorders." *Obesity (Silver Spring)* 26 (5):792-800. doi: 10.1002/oby.22175.
- Rau, M., A. Rehman, M. Dittrich, A. K. Groen, H. M. Hermanns, F. Seyfried, N. Beyersdorf, T. Dandekar, P. Rosenstiel, and A. Geier. 2018. "Fecal SCFAs and SCFA-producing bacteria in gut microbiome of human NAFLD as a putative link to systemic T-cell activation and advanced disease." *United European Gastroenterol J* 6 (10):1496-507. doi: 10.1177/2050640618804444.
- Rauf, A., M. Imran, H. A. R. Suleria, B. Ahmad, D. G. Peters, and M. S. Mubarak. 2017. "A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol." *Food Funct* 8 (12):4284-305. doi: 10.1039/c7fo01300k.

- Ravi, K, S Rajasekaran, and S Subramanian. 2003. "Hypoglycemic effect of Eugenia jambolana seed kernels on streptozotocin-induced diabetes in rats." *Pharmaceutical biology* 41 (8):598-603.
- Ravi, K., S. Rajasekaran, and S. Subramanian. 2005a. "Antihyperlipidemic effect of Eugenia jambolana seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats." *Food Chem Toxicol* 43 (9):1433-9. doi: 10.1016/j.fct.2005.04.004.
- Ravi, Kasiappan, Subbaih Rajasekaran, and Sorimuthu Subramanian. 2005b. "Antihyperlipidemic effect of Eugenia jambolana seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats." *Food and chemical toxicology* 43 (9):1433-9.
- Razzaque, M. S. 2020. "Overconsumption of sugar-sweetened beverages: Why is it difficult to control?" *J Popul Ther Clin Pharmacol* 27 (2):e51-e7. doi: 10.15586/jptcp.v27i2.678.
- Reaven, G. M. 1988. "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." *Diabetes* 37 (12):1595-607. doi: 10.2337/diab.37.12.1595.
- Rekha, Namasivayam, Ramachandran Balaji, and Munuswamy Deecaraman. 2008. "Effect of aqueous extract of Syzygium cumini pulp on antioxidant defense system in streptozotocin induced diabetic rats." *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 7 (2):137-0.
- Riehle, C., and E. D. Abel. 2016. "Insulin Signaling and Heart Failure." *Circ Res* 118 (7):1151-69. doi: 10.1161/circresaha.116.306206.
- Rinaldi, L., P. C. Pafundi, R. Galiero, A. Caturano, M. V. Morone, C. Silvestri, M. Giordano, T. Salvatore, and F. C. Sasso. 2021. "Mechanisms of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in the Metabolic Syndrome. A Narrative Review." *Antioxidants (Basel)* 10 (2). doi: 10.3390/antiox10020270.
- Rinninella, E., M. Cintoni, P. Raoul, L. R. Lopetuso, F. Scaldaferri, G. Pulcini, G. A. D. Miggiano, A. Gasbarrini, and M. C. Mele. 2019. "Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition." *Nutrients* 11 (10). doi: 10.3390/nu11102393.
- Roberts, C. K., A. L. Hevener, and R. J. Barnard. 2013. "Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training." *Compr Physiol* 3 (1):1-58. doi: 10.1002/cphy.c110062.
- Rochlani, Y., N. V. Pothineni, S. Kovelamudi, and J. L. Mehta. 2017. "Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds." *Ther Adv Cardiovasc Dis* 11 (8):215-25. doi: 10.1177/1753944717711379.
- Rook, G., F. Backhed, B. R. Levin, M. J. McFall-Ngai, and A. R. McLean. 2017. "Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity." *Lancet* 390 (10093):521-30. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30566-4.
- Roopchand, D. E., R. N. Carmody, P. Kuhn, K. Moskal, P. Rojas-Silva, P. J. Turnbaugh, and I. Raskin. 2015. "Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome." *Diabetes* 64 (8):2847-58. doi: 10.2337/db14-1916.
- Ruiz, A. G., F. Casafont, J. Crespo, A. Cayón, M. Mayorga, A. Estebanez, J. C. Fernandez-Escalante, and F. Pons-Romero. 2007. "Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF- $\alpha$  gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." *Obes Surg* 17 (10):1374-80. doi: 10.1007/s11695-007-9243-7.
- Rumberger, J. M., J. R. Arch, and A. Green. 2014. "Butyrate and other short-chain fatty acids increase the rate of lipolysis in 3T3-L1 adipocytes." *PeerJ* 2:e611. doi: 10.7717/peerj.611.
- Saklayen, M. G. 2018. "The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome." *Curr Hypertens Rep* 20 (2):12. doi: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- Samuel, B. S., A. Shaito, T. Motoike, F. E. Rey, F. Backhed, J. K. Manchester, R. E. Hammer, et al. 2008. "Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (43):16767-72. doi: 10.1073/pnas.0808567105.
- Samuel, V. T., and G. I. Shulman. 2012. "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." *Cell* 148 (5):852-71. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.017.
- . 2016. "The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux." *J Clin Invest* 126 (1):12-22. doi: 10.1172/jci77812.

- Sanches, J. R., L. M. França, V. T. Chagas, R. S. Gaspar, K. A. Dos Santos, L. M. Gonçalves, D. M. Sloboda, et al. 2016. "Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats." *Front Pharmacol* 7:48. doi: 10.3389/fphar.2016.00048.
- Sánchez-Tapia, M., A. W. Miller, O. Granados-Portillo, A. R. Tovar, and N. Torres. 2020. "The development of metabolic endotoxemia is dependent on the type of sweetener and the presence of saturated fat in the diet." *Gut Microbes* 12 (1):1801301. doi: 10.1080/19490976.2020.1801301.
- Sanders, M. E., D. J. Merenstein, G. Reid, G. R. Gibson, and R. A. Rastall. 2019. "Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3.
- Santos, I. B., G. F. de Bem, V. S. C. Cordeiro, C. A. da Costa, Lcrm de Carvalho, A. P. M. da Rocha, G. F. da Costa, D. T. Ognibene, R. S. de Moura, and A. C. Resende. 2017. "Supplementation with *Vitis vinifera* L. skin extract improves insulin resistance and prevents hepatic lipid accumulation and steatosis in high-fat diet-fed mice." *Nutr Res* 43:69-81. doi: 10.1016/j.nutres.2017.05.007.
- Satokari, R. 2020. "High Intake of Sugar and the Balance between Pro- and Anti-Inflammatory Gut Bacteria." *Nutrients* 12 (5). doi: 10.3390/nu12051348.
- Schiano, C., V. Grimaldi, M. Scognamiglio, D. Costa, A. Soricelli, G. F. Nicoletti, and C. Napoli. 2021. "Soft drinks and sweeteners intake: Possible contribution to the development of metabolic syndrome and cardiovascular diseases. Beneficial or detrimental action of alternative sweeteners?" *Food Res Int* 142:110220. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110220.
- Schoenfelder, Tatiana, Carolini Z Warmlin, Michele S Manfredini, Larissa L Pavei, Juana V Réus, Taciane C Tristão, Marcelo S Fernandes, and Luciane Costa-Campos. 2010. "Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae. in diabetic rats." *Revista Brasileira de farmacognosia* 20 (2):222-7.
- Schossler, Deila Rosély C, Cinthia Melazzo Mazzanti, Sônia Cristina Almeida da Luz, Andreane Filappi, Danívia Prestes, Aron Ferreira da Silveira, and Marcelo Cecim. 2004. "Syzygium cumini and the regeneration of insulin positive cells from the pancreatic duct." *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 41 (4):236-9.
- Schwer, B., M. Eckersdorff, Y. Li, J. C. Silva, D. Fermin, M. V. Kurtev, C. Giallourakis, M. J. Comb, F. W. Alt, and D. B. Lombard. 2009. "Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation." *Aging Cell* 8 (5):604-6. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00503.x.
- Schwiertz, A., D. Taras, K. Schafer, S. Beijer, N. A. Bos, C. Donus, and P. D. Hardt. 2010. "Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects." *Obesity (Silver Spring)* 18 (1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167.
- Schwiertz, A., D. Taras, K. Schäfer, S. Beijer, N. A. Bos, C. Donus, and P. D. Hardt. 2010. "Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects." *Obesity (Silver Spring)* 18 (1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167.
- Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo. 2016. "Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body." *PLoS Biol* 14 (8):e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- Seregin, S. S., N. Golovchenko, B. Schaf, J. Chen, N. A. Pudlo, J. Mitchell, N. T. Baxter, et al. 2017. "NLRP6 Protects Il10(-/-) Mice from Colitis by Limiting Colonization of Akkermansia muciniphila." *Cell Rep* 19 (4):733-45. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.080.
- Shabana, S. U. Shahid, and U. Irfan. 2018. "The gut microbiota and its potential role in obesity." *Future Microbiol* 13:589-603. doi: 10.2217/fmb-2017-0179.
- Sharma, B., C. Balomajumder, and P. Roy. 2008a. "Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats." *Food Chem Toxicol* 46 (7):2376-83. doi: 10.1016/j.fct.2008.03.020.
- Sharma, Bhavna, Chandrajeet Balomajumder, and Partha Roy. 2008b. "Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats." *Food and chemical toxicology* 46 (7):2376-83.
- Sharma, Bhavna, G Viswanath, Rajani Salunke, and Partha Roy. 2008. "Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice." *Food chemistry* 110 (3):697-705.

- Sharma, S., and P. Tripathi. 2019. "Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go?" *J Nutr Biochem* 63:101-8. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.10.003.
- Shen, F., R. D. Zheng, X. Q. Sun, W. J. Ding, X. Y. Wang, and J. G. Fan. 2017. "Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 16 (4):375-81. doi: 10.1016/s1499-3872(17)60019-5.
- Shen, W., M. Shen, X. Zhao, H. Zhu, Y. Yang, S. Lu, Y. Tan, et al. 2017. "Anti-obesity Effect of Capsaicin in Mice Fed with High-Fat Diet Is Associated with an Increase in Population of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila*." *Front Microbiol* 8:272. doi: 10.3389/fmicb.2017.00272.
- Shoelson, S. E., J. Lee, and A. B. Goldfine. 2006. "Inflammation and insulin resistance." *J Clin Invest* 116 (7):1793-801. doi: 10.1172/JCI29069.
- Silva, Selma do N, Iracelle C Abreu, Graciela Fernanda C Silva, Rachel M Ribeiro, Adelson de S Lopes, Maria do Socorro de S Cartágenes, Sônia Maria de F Freire, Antônio Carlos R Borges, and Marilene Oliveira da R Borges. 2012. "The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents." *Revista Brasileira de farmacognosia* 22 (1):102-8.
- Simon, M. C., K. Strassburger, B. Nowotny, H. Kolb, P. Nowotny, V. Burkart, F. Zivehe, et al. 2015. "Intake of *Lactobacillus reuteri* improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: a proof of concept." *Diabetes Care* 38 (10):1827-34. doi: 10.2337/dc14-2690.
- Singh, R. K., H. W. Chang, D. Yan, K. M. Lee, D. Ucmak, K. Wong, M. Abrouk, et al. 2017. "Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health." *J Transl Med* 15 (1):73. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
- Singh, T. P., R. K. Malik, S. G. Katkamwar, and G. Kaur. 2015. "Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus reuteri* LR6 in rats fed on high-cholesterol diet." *Int J Food Sci Nutr* 66 (1):71-5. doi: 10.3109/09637486.2014.953450.
- Sobrecases, H., K. A. Lê, M. Bortolotti, P. Schneiter, M. Ith, R. Kreis, C. Boesch, and L. Tappy. 2010. "Effects of short-term overfeeding with fructose, fat and fructose plus fat on plasma and hepatic lipids in healthy men." *Diabetes Metab* 36 (3):244-6. doi: 10.1016/j.diabet.2010.03.003.
- Softic, S., J. G. Meyer, G. X. Wang, M. K. Gupta, T. M. Batista, Hpmm Lauritzen, S. Fujisaka, et al. 2019. "Dietary Sugars Alter Hepatic Fatty Acid Oxidation via Transcriptional and Post-translational Modifications of Mitochondrial Proteins." *Cell Metab* 30 (4):735-53.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2019.09.003.
- Song, J. X., H. Ren, Y. F. Gao, C. Y. Lee, S. F. Li, F. Zhang, L. Li, and H. Chen. 2017. "Dietary Capsaicin Improves Glucose Homeostasis and Alters the Gut Microbiota in Obese Diabetic ob/ob Mice." *Front Physiol* 8:602. doi: 10.3389/fphys.2017.00602.
- Sousa, R. M. L., N. L. X. Ribeiro, B. A. S. Pinto, J. R. Sanches, M. U. da Silva, C. F. F. Coelho, L. M. Franca, J. A. de Figueiredo Neto, and A. M. A. Paes. 2018. "Long-term high-protein diet intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed adult rats." *Nutr Metab (Lond)* 15:53. doi: 10.1186/s12986-018-0290-y.
- Sreng, N., S. Champion, J. C. Martin, S. Khelaifia, J. E. Christensen, R. Padmanabhan, V. Azalbert, et al. 2019. "Resveratrol-mediated glycemic regulation is blunted by curcumin and is associated to modulation of gut microbiota." *J Nutr Biochem* 72:108218. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108218.
- Srivastava, Shalini, and Deepak Chandra. 2013. "Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 (9):2084-93.
- Steensels, S., J. Qiao, Y. Zhang, K. M. Maner-Smith, N. Kika, C. D. Holman, K. E. Corey, W. C. Bracken, E. A. Ortlund, and B. A. Ersoy. 2020. "Acyl-Coenzyme A Thioesterase 9 Traffics Mitochondrial Short-Chain Fatty Acids Toward De Novo Lipogenesis and Glucose Production in the Liver." *Hepatology* 72 (3):857-72. doi: 10.1002/hep.31409.
- Stefanello, Maria Élide Alves, Aislan CRF Pascoal, and Marcos J Salvador. 2011. "Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties." *Chemistry & biodiversity* 8 (1):73-94.
- Stinson, L. F., M. S. Payne, and J. A. Keelan. 2017. "Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota." *Crit Rev Microbiol* 43 (3):352-69. doi: 10.1080/1040841X.2016.1211088.

- "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." 2012. *Nature* 486 (7402):207-14. doi: 10.1038/nature11234.
- Stumpff, F. 2018. "A look at the smelly side of physiology: transport of short chain fatty acids." *Pflugers Arch* 470 (4):571-98. doi: 10.1007/s00424-017-2105-9.
- Sung, M. M., T. T. Kim, E. Denou, C. M. Soltys, S. M. Hamza, N. J. Byrne, G. Masson, et al. 2017. "Improved Glucose Homeostasis in Obese Mice Treated With Resveratrol Is Associated With Alterations in the Gut Microbiome." *Diabetes* 66 (2):418-25. doi: 10.2337/db16-0680.
- Szanto, I., P. Gergely, Z. Marcsek, T. Banyasz, J. Somogyi, and P. Csermely. 1995. "Changes of the 78 kDa glucose-regulated protein (grp78) in livers of diabetic rats." *Acta Physiol Hung* 83 (4):333-42.
- Tain, Y. L., W. C. Lee, K. L. H. Wu, S. Leu, and J. Y. H. Chan. 2018. "Resveratrol Prevents the Development of Hypertension Programmed by Maternal Plus Post-Weaning High-Fructose Consumption through Modulation of Oxidative Stress, Nutrient-Sensing Signals, and Gut Microbiota." *Mol Nutr Food Res*:e1800066. doi: 10.1002/mnfr.201800066.
- Tamburini, S., N. Shen, H. C. Wu, and J. C. Clemente. 2016. "The microbiome in early life: implications for health outcomes." *Nat Med* 22 (7):713-22. doi: 10.1038/nm.4142.
- Tan, J., C. McKenzie, M. Potamitis, A. N. Thorburn, C. R. Mackay, and L. Macia. 2014. "The role of short-chain fatty acids in health and disease." *Adv Immunol* 121:91-119. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9.
- Tang, W. H. W., F. Bäckhed, U. Landmesser, and S. L. Hazen. 2019. "Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease: JACC State-of-the-Art Review." *J Am Coll Cardiol* 73 (16):2089-105. doi: 10.1016/j.jacc.2019.03.024.
- Taskinen, M. R., and J. Borén. 2015. "New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes." *Atherosclerosis* 239 (2):483-95. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.039.
- Tchkonia, T., T. Thomou, Y. Zhu, I. Karagiannides, C. Pothoulakis, M. D. Jensen, and J. L. Kirkland. 2013. "Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots." *Cell Metab* 17 (5):644-56. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.008.
- Tenorio-Jiménez, C., M. J. Martínez-Ramírez, I. Del Castillo-Codes, C. Arraiza-Irigoyen, M. Tercero-Lozano, J. Camacho, N. Chueca, et al. 2019. "Lactobacillus reuteri V3401 Reduces Inflammatory Biomarkers and Modifies the Gastrointestinal Microbiome in Adults with Metabolic Syndrome: The PROSIR Study." *Nutrients* 11 (8). doi: 10.3390/nu11081761.
- Ter Horst, K. W., and M. J. Serlie. 2017. "Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Nutrients* 9 (9). doi: 10.3390/nu9090981.
- Thangaraju, M., G. A. Cresci, K. Liu, S. Ananth, J. P. Gnanaprakasam, D. D. Browning, J. D. Mellinger, et al. 2009. "GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon." *Cancer Res* 69 (7):2826-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4466.
- Tilg, H., P. D. Cani, and E. A. Mayer. 2016. "Gut microbiome and liver diseases." *Gut* 65 (12):2035-44. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312729.
- Tolhurst, G., H. Heffron, Y. S. Lam, H. E. Parker, A. M. Habib, E. Diakogiannaki, J. Cameron, J. Grosse, F. Reimann, and F. M. Gribble. 2012. "Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2." *Diabetes* 61 (2):364-71. doi: 10.2337/db11-1019.
- Tomás-Barberán, F. A., M. V. Selma, and J. C. Espín. 2016. "Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 19 (6):471-6. doi: 10.1097/mco.0000000000000314.
- Tremblay, A., H. Arguin, and S. Panahi. 2016. "Capsaicinoids: a spicy solution to the management of obesity?" *Int J Obes (Lond)* 40 (8):1198-204. doi: 10.1038/ijo.2015.253.
- "Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants." 2016. *Lancet* 387 (10026):1377-96. doi: 10.1016/s0140-6736(16)30054-x.
- Tripathi, A. K., and S. Kohli. 2014. "Pharmacognostical standardization and antidiabetic activity of *Syzygium cumini* (Linn.) barks (Myrtaceae) on streptozotocin-induced diabetic rats." *J Complement Integr Med* 11 (2):71-81. doi: 10.1515/jcim-2014-0011.

- Tripathi, P., R. Tripathi, R. K. Patel, and S. S. Pancholi. 2013. "Investigation of antimutagenic potential of *Foeniculum vulgare* essential oil on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice." *Drug Chem Toxicol* 36 (1):35-41. doi: 10.3109/01480545.2011.648328.
- Tsao, R. 2010. "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols." *Nutrients* 2 (12):1231-46. doi: 10.3390/nu2121231.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. Hamady, C. M. Fraser-Liggett, R. Knight, and J. I. Gordon. 2007. "The human microbiome project." *Nature* 449 (7164):804-10. doi: 10.1038/nature06244.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon. 2006. "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." *Nature* 444 (7122):1027-31. doi: 10.1038/nature05414.
- Tzeng, T. F., S. S. Liou, and I. M. Liu. 2011. "Myricetin Ameliorates Defective Post-Receptor Insulin Signaling via beta-Endorphin Signaling in the Skeletal Muscles of Fructose-Fed Rats." *Evid Based Complement Alternat Med* 2011:150752. doi: 10.1093/ecam/neq017.
- Ulla, A., M. A. Alam, B. Sikder, F. A. Sumi, M. M. Rahman, Z. F. Habib, M. K. Mohammed, N. Subhan, H. Hossain, and H. M. Reza. 2017. "Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats." *BMC Complement Altern Med* 17 (1):289. doi: 10.1186/s12906-017-1799-8.
- Unno, T., T. Hisada, and S. Takahashi. 2015. "Hesperetin Modifies the Composition of Fecal Microbiota and Increases Cecal Levels of Short-Chain Fatty Acids in Rats." *J Agric Food Chem* 63 (36):7952-7. doi: 10.1021/acs.jafc.5b02649.
- Unno, T., M. Sakuma, and S. Mitsuhashi. 2014. "Effect of dietary supplementation of (-)-epigallocatechin gallate on gut microbiota and biomarkers of colonic fermentation in rats." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 60 (3):213-9. doi: 10.3177/jnsv.60.213.
- Ushiroda, C., Y. Naito, T. Takagi, K. Uchiyama, K. Mizushima, Y. Higashimura, Z. Yasukawa, et al. 2019. "Green tea polyphenol (epigallocatechin-3-gallate) improves gut dysbiosis and serum bile acids dysregulation in high-fat diet-fed mice." *J Clin Biochem Nutr* 65 (1):34-46. doi: 10.3164/jcfn.18-116.
- Vallianou, N., T. Stratigou, G. S. Christodoulatos, and M. Dalamaga. 2019. "Understanding the Role of the Gut Microbiome and Microbial Metabolites in Obesity and Obesity-Associated Metabolic Disorders: Current Evidence and Perspectives." *Curr Obes Rep* 8 (3):317-32. doi: 10.1007/s13679-019-00352-2.
- van der Beek, C. M., E. E. Canfora, K. Lenaerts, F. J. Troost, Swmo Damink, J. J. Holst, A. A. M. Masclee, C. H. C. Dejong, and E. E. Blaak. 2016. "Distal, not proximal, colonic acetate infusions promote fat oxidation and improve metabolic markers in overweight/obese men." *Clin Sci (Lond)* 130 (22):2073-82. doi: 10.1042/cs20160263.
- Verdin, E., and M. Ott. 2015. "50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* 16 (4):258-64. doi: 10.1038/nrm3931.
- VIGITEL, Brasil. 2019. "vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis." *Brasília: Ministério da Saúde*.
- Villalpando-Arteaga, E. V., E. Mendieta-Condado, H. Esquivel-Solís, A. A. Canales-Aguirre, F. J. Gálvez-Gastélum, J. C. Mateos-Díaz, J. A. Rodríguez-González, and A. L. Márquez-Aguirre. 2013. "Hibiscus sabdariffa L. aqueous extract attenuates hepatic steatosis through down-regulation of PPAR- $\gamma$  and SREBP-1c in diet-induced obese mice." *Food Funct* 4 (4):618-26. doi: 10.1039/c3fo30270a.
- Vulevic, J., A. Juric, G. Tzortzis, and G. R. Gibson. 2013. "A mixture of trans-galactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults." *J Nutr* 143 (3):324-31. doi: 10.3945/jn.112.166132.
- Walker, J. M., P. Eckardt, J. O. Aleman, J. C. da Rosa, Y. Liang, T. Iizumi, S. Etheve, M. J. Blaser, L. Breslow J, and P. R. Holt. 2019. "The effects of trans-resveratrol on insulin resistance,



- inflammation, and microbiota in men with the metabolic syndrome: A pilot randomized, placebo-controlled clinical trial." *J Clin Transl Res* 4 (2):122-35.
- Wang, H. X., and Y. P. Wang. 2016. "Gut Microbiota-brain Axis." *Chin Med J (Engl)* 129 (19):2373-80. doi: 10.4103/0366-6999.190667.
- Wang, J., L. Tang, H. Zhou, J. Zhou, T. C. Glenn, C. L. Shen, and J. S. Wang. 2018. "Long-term treatment with green tea polyphenols modifies the gut microbiome of female sprague-dawley rats." *J Nutr Biochem* 56:55-64. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.01.005.
- Wang, L., B. Zeng, Z. Liu, Z. Liao, Q. Zhong, L. Gu, H. Wei, and X. Fang. 2018. "Green Tea Polyphenols Modulate Colonic Microbiota Diversity and Lipid Metabolism in High-Fat Diet Treated HFA Mice." *J Food Sci* 83 (3):864-73. doi: 10.1111/1750-3841.14058.
- Wang, N., Y. Ma, Z. Liu, L. Liu, K. Yang, Y. Wei, Y. Liu, X. Chen, X. Sun, and D. Wen. 2019. "Hydroxytyrosol prevents PM2.5-induced adiposity and insulin resistance by restraining oxidative stress related NF-kappaB pathway and modulation of gut microbiota in a murine model." *Free Radic Biol Med* 141:393-407. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.002.
- Wang, P., D. Li, W. Ke, D. Liang, X. Hu, and F. Chen. 2020. "Resveratrol-induced gut microbiota reduces obesity in high-fat diet-fed mice." *Int J Obes (Lond)* 44 (1):213-25. doi: 10.1038/s41366-019-0332-1.
- Wang, Y., C. Tang, Y. Tang, H. Yin, and X. Liu. 2020. "Capsaicin has an anti-obesity effect through alterations in gut microbiota populations and short-chain fatty acid concentrations." *Food Nutr Res* 64. doi: 10.29219/fnr.v64.3525.
- Wein, S., N. Behm, R. K. Petersen, K. Kristiansen, and S. Wolfram. 2010. "Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR-gamma independent mechanism." *Eur J Pharm Sci* 41 (1):16-22. doi: 10.1016/j.ejps.2010.05.004.
- Wellen, K. E., and G. S. Hotamisligil. 2005. "Inflammation, stress, and diabetes." *J Clin Invest* 115 (5):1111-9. doi: 10.1172/JCI25102.
- Whelan, F. J., C. P. Verschoor, J. C. Stearns, L. Rossi, K. Luinstra, M. Loeb, M. Smieja, J. Johnstone, M. G. Surette, and D. M. Bowdish. 2014. "The loss of topography in the microbial communities of the upper respiratory tract in the elderly." *Ann Am Thorac Soc* 11 (4):513-21. doi: 10.1513/AnnalsATS.201310-351OC.
- Williamson, G., and M. N. Clifford. 2017. "Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols." *Biochem Pharmacol* 139:24-39. doi: 10.1016/j.bcp.2017.03.012.
- Wittekind, A., and J. Walton. 2014. "Worldwide trends in dietary sugars intake." *Nutr Res Rev* 27 (2):330-45. doi: 10.1017/s0954422414000237.
- Wong, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam, and D. J. Jenkins. 2006. "Colonic health: fermentation and short chain fatty acids." *J Clin Gastroenterol* 40 (3):235-43.
- "Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults." 2017. *Lancet* 390 (10113):2627-42. doi: 10.1016/s0140-6736(17)32129-3.
- Xiao, S., N. Fei, X. Pang, J. Shen, L. Wang, B. Zhang, M. Zhang, et al. 2014. "A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome." *FEMS Microbiol Ecol* 87 (2):357-67. doi: 10.1111/1574-6941.12228.
- Yamagishi, N., T. Ueda, A. Mori, Y. Saito, and T. Hatayama. 2012. "Decreased expression of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 in liver of diabetic mice." *Biochem Biophys Res Commun* 417 (1):364-70. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.118.
- Yamashita, H., K. Fujisawa, E. Ito, S. Idei, N. Kawaguchi, M. Kimoto, M. Hiemori, and H. Tsuji. 2007. "Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats." *Biosci Biotechnol Biochem* 71 (5):1236-43.
- Yang, C., Q. Deng, J. Xu, X. Wang, C. Hu, H. Tang, and F. Huang. 2019. "Sinapic acid and resveratrol alleviate oxidative stress with modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed rats." *Food Res Int* 116:1202-11. doi: 10.1016/j.foodres.2018.10.003.
- Yang, M., Y. Liu, H. Xie, Z. Wen, Y. Zhang, C. Wu, L. Huang, et al. 2019. "Gut Microbiota Composition and Structure of the Ob/Ob and Db/Db Mice." *Int J Endocrinol* 2019:1394097. doi: 10.1155/2019/1394097.

- Yatsunenکو, T., F. E. Rey, M. J. Manary, I. Trehan, M. G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, et al. 2012. "Human gut microbiome viewed across age and geography." *Nature* 486 (7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053.
- Zhang, D. M., R. Q. Jiao, and L. D. Kong. 2017. "High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions." *Nutrients* 9 (4). doi: 10.3390/nu9040335.
- Zhang, L., S. Pagoto, C. May, B. Olendzki, L. Tucker K, C. Ruiz, Y. Cao, and Y. Ma. 2018. "Effect of AHA dietary counselling on added sugar intake among participants with metabolic syndrome." *Eur J Nutr* 57 (3):1073-82. doi: 10.1007/s00394-017-1390-6.
- Zhao, Y., P. Dua, and W. J. Lukiw. 2015. "Microbial Sources of Amyloid and Relevance to Amyloidogenesis and Alzheimer's Disease (AD)." *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 5 (1):177. doi: 10.4172/2161-0460.1000177.
- Zheng, C. J., R. Liu, B. Xue, J. Luo, L. Gao, Y. Wang, S. Ou, S. Li, and X. Peng. 2017. "Impact and consequences of polyphenols and fructooligosaccharide interplay on gut microbiota in rats." *Food Funct* 8 (5):1925-32. doi: 10.1039/c6fo01783e.
- Zhu, L., S. S. Baker, C. Gill, W. Liu, R. Alkhouri, R. D. Baker, and S. R. Gill. 2013. "Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH." *Hepatology* 57 (2):601-9. doi: 10.1002/hep.26093.

## Referências

- Aguilar, M., T. Bhuket, S. Torres, B. Liu, and R. J. Wong. 2015. "Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012." *Jama* 313 (19):1973-4. doi: 10.1001/jama.2015.4260.
- Ahn, J., H. Lee, S. Kim, J. Park, and T. Ha. 2008. "The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways." *Biochem Biophys Res Commun* 373 (4):545-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.077.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, C. M. Loria, and S. C. Smith, Jr. 2009. "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* 120 (16):1640-5. doi: 10.1161/circulationaha.109.192644.
- Ali, I., R. J. Conrad, E. Verdin, and M. Ott. 2018. "Lysine Acetylation Goes Global: From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics." *Chem Rev* 118 (3):1216-52. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00181.
- Anandharajan, R., S. Jaiganesh, N. P. Shankernarayanan, R. A. Viswakarma, and A. Balakrishnan. 2006. "In vitro glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of Glut-4, PI3 kinase and PPARgamma in L6 myotubes." *Phytomedicine* 13 (6):434-41. doi: 10.1016/j.phymed.2005.03.008.
- Anhe, F. F., D. Roy, G. Pilon, S. Dudonne, S. Matamoros, T. V. Varin, C. Garofalo, et al. 2015. "A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice." *Gut* 64 (6):872-83. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307142.
- Anhê, F. F., T. V. Varin, M. Le Barz, G. Pilon, S. Dudonné, J. Trottier, P. St-Pierre, et al. 2018. "Arctic berry extracts target the gut-liver axis to alleviate metabolic endotoxaemia, insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obese mice." *Diabetologia* 61 (4):919-31. doi: 10.1007/s00125-017-4520-z.
- Anhe, F. F., T. V. Varin, M. Le Barz, G. Pilon, S. Dudonne, J. Trottier, P. St-Pierre, et al. 2018. "Arctic berry extracts target the gut-liver axis to alleviate metabolic endotoxaemia, insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obese mice." *Diabetologia* 61 (4):919-31. doi: 10.1007/s00125-017-4520-z.
- Aoki, R., K. Kamikado, W. Suda, H. Takii, Y. Mikami, N. Suganuma, M. Hattori, and Y. Koga. 2017. "A proliferative probiotic *Bifidobacterium* strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation." *Sci Rep* 7:43522. doi: 10.1038/srep43522.
- Aqil, F., A. Gupta, R. Munagala, J. Jeyabalan, H. Kausar, R. J. Sharma, I. P. Singh, and R. C. Gupta. 2012. "Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry)." *Nutr Cancer* 64 (3):428-38. doi: 10.1080/01635581.2012.657766.
- Armougom, F., M. Henry, B. Vialettes, D. Raccach, and D. Raoult. 2009. "Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients." *PLoS One* 4 (9):e7125. doi: 10.1371/journal.pone.0007125.
- Aron-Wisniewsky, J., C. Vigliotti, J. Witjes, P. Le, A. G. Holleboom, J. Verheij, M. Nieuwdorp, and K. Clément. 2020. "Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17 (5):279-97. doi: 10.1038/s41575-020-0269-9.

- Arun, R., M. V. Prakash, S. K. Abraham, and K. Premkumar. 2011. "Role of *Syzygium cumini* seed extract in the chemoprevention of in vivo genomic damage and oxidative stress." *J Ethnopharmacol* 134 (2):329-33. doi: 10.1016/j.jep.2010.12.014.
- Ayyanar, M., and P. Subash-Babu. 2012. "*Syzygium cumini* (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses." *Asian Pac J Trop Biomed* 2 (3):240-6. doi: 10.1016/s2221-1691(12)60050-1.
- Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. 2004. "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (44):15718-23. doi: 10.1073/pnas.0407076101.
- Bäckhed, F., J. K. Manchester, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. 2007. "Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (3):979-84. doi: 10.1073/pnas.0605374104.
- Baeza, J., M. J. Smallegan, and J. M. Denu. 2015. "Site-specific reactivity of nonenzymatic lysine acetylation." *ACS Chem Biol* 10 (1):122-8. doi: 10.1021/cb500848p.
- Baldissera, G., N. D. Sperotto, H. T. Rosa, J. G. Henn, V. F. Peres, D. J. Moura, R. Roehrs, et al. 2016. "Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin." *J Ethnopharmacol* 194:1012-21. doi: 10.1016/j.jep.2016.10.056.
- Baliga, Manjeshwar Shrinath, Harshith P Bhat, Bantwal Raghavendra Vittaldas Baliga, Rajesh Wilson, and Princy Louis Palatty. 2011. "Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam.(black plum): a review." *Food Research International* 44 (7):1776-89.
- Bardy, G., A. Virsolvy, J. F. Quignard, M. A. Ravier, G. Bertrand, S. Dalle, G. Cros, R. Magous, S. Richard, and C. Oiry. 2013. "Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells." *Br J Pharmacol* 169 (5):1102-13. doi: 10.1111/bph.12194.
- Bhandary, M. J., K. R. Chandrashekar, and K. M. Kaveriappa. 1995. "Medical ethnobotany of the Siddis of Uttara Kannada district, Karnataka, India." *J Ethnopharmacol* 47 (3):149-58. doi: 10.1016/0378-8741(95)01274-h.
- Bialonska, D., P. Ramnani, S. G. Kasimsetty, K. R. Muntha, G. R. Gibson, and D. Ferreira. 2010. "The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota." *Int J Food Microbiol* 140 (2-3):175-82. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.038.
- Biddinger, S. B., A. Hernandez-Ono, C. Rask-Madsen, J. T. Haas, J. O. Alemán, R. Suzuki, E. F. Scapa, et al. 2008. "Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis." *Cell Metab* 7 (2):125-34. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.013.
- Blüher, M. 2019. "Obesity: global epidemiology and pathogenesis." *Nat Rev Endocrinol* 15 (5):288-98. doi: 10.1038/s41574-019-0176-8.
- Bok, S. H., S. Y. Park, Y. B. Park, M. K. Lee, S. M. Jeon, T. S. Jeong, and M. S. Choi. 2002. "Quercetin dihydrate and gallate supplements lower plasma and hepatic lipids and change activities of hepatic antioxidant enzymes in high cholesterol-fed rats." *Int J Vitam Nutr Res* 72 (3):161-9. doi: 10.1024/0300-9831.72.3.161.
- Boursier, Jerome, and Anna Mae Diehl. 2016. "Nonalcoholic fatty liver disease and the gut microbiome." *Clinics in liver disease* 20 (2):263-75.
- Brahe, L. K., A. Astrup, and L. H. Larsen. 2016. "Can We Prevent Obesity-Related Metabolic Diseases by Dietary Modulation of the Gut Microbiota?" *Adv Nutr* 7 (1):90-101. doi: 10.3945/an.115.010587.
- BRASIL, and Ministério da Saúde. 2009. "RENISUS—Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais." In: DAF/SCTIE/MS—RENISUS.
- Bresson, Jean-Louis, Albert Flynn, Marina Heinonen, Karin Hulshof, Hannu Korhonen, Pagona Lagiou, Martinus Løvik, Rosangela Marchelli, Ambroise Martin, and Bevan Moseley. 2009. "Review of Labelling Reference Intake Values—Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a Request from the Commission Related to the Review of Labelling Reference Intake Values for Selected Nutritional Elements." *EFSA J* 1008:1-14.

- Cani, P. D. 2018. "Human gut microbiome: hopes, threats and promises." *Gut* 67 (9):1716-25. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316723.
- Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, et al. 2007. "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* 56 (7):1761-72. doi: 10.2337/db06-1491.
- Cani, P. D., and B. F. Jordan. 2018. "Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15 (11):671-82. doi: 10.1038/s41575-018-0025-6.
- Cani, P. D., M. Osto, L. Geurts, and A. Everard. 2012. "Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity." *Gut Microbes* 3 (4):279-88. doi: 10.4161/gmic.19625.
- Chagas, V. T., L. M. França, S. Malik, and A. M. Paes. 2015. "Syzygium cumini (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases." *Front Pharmacol* 6:259. doi: 10.3389/fphar.2015.00259.
- Chambers, E. S., A. Viardot, A. Psichas, D. J. Morrison, K. G. Murphy, S. E. Zac-Varghese, K. MacDougall, et al. 2015. "Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults." *Gut* 64 (11):1744-54. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307913.
- Chang, C. J., T. F. Tzeng, S. S. Liou, Y. S. Chang, and I. M. Liu. 2012. "Myricetin Increases Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Protein Expression and Decreases Plasma Lipids and Adiposity in Rats." *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:787152. doi: 10.1155/2012/787152.
- Choi, S. M., D. F. Tucker, D. N. Gross, R. M. Easton, L. M. DiPilato, A. S. Dean, B. R. Monks, and M. J. Birnbaum. 2010. "Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway." *Mol Cell Biol* 30 (21):5009-20. doi: 10.1128/mcb.00797-10.
- Coskun, O., M. Kanter, A. Korkmaz, and S. Oter. 2005. "Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas." *Pharmacol Res* 51 (2):117-23. doi: 10.1016/j.phrs.2004.06.002.
- Crescenzo, R., F. Bianco, I. Falcone, P. Coppola, G. Liverini, and S. Iossa. 2013. "Increased hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose." *Eur J Nutr* 52 (2):537-45. doi: 10.1007/s00394-012-0356-y.
- Czech, M. P. 2017. "Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes." *Nat Med* 23 (7):804-14. doi: 10.1038/nm.4350.
- de Oliveira Neves, V. G., D. T. de Oliveira, D. C. Oliveira, L. Oliveira Perucci, T. A. P. Dos Santos, I. da Costa Fernandes, G. G. de Sousa, N. R. Barboza, and R. Guerra-Sá. 2020. "High-sugar diet intake, physical activity, and gut microbiota crosstalk: Implications for obesity in rats." *Food Sci Nutr* 8 (10):5683-95. doi: 10.1002/fsn3.1842.
- De Vadder, F., P. Kovatcheva-Datchary, D. Goncalves, J. Vinera, C. Zitoun, A. Duchamp, F. Backhed, and G. Mithieux. 2014. "Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits." *Cell* 156 (1-2):84-96. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.016.
- den Besten, G., K. Lange, R. Havinga, T. H. van Dijk, A. Gerding, K. van Eunen, M. Müller, et al. 2013. "Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305 (12):G900-10. doi: 10.1152/ajpgi.00265.2013.
- den Besten, G., K. van Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D. J. Reijngoud, and B. M. Bakker. 2013. "The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism." *J Lipid Res* 54 (9):2325-40. doi: 10.1194/jlr.R036012.
- Dickel, Michele Luciane, Stela Maris Kuze Rates, and Mara Rejane Ritter. 2007. "Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil." *Journal of ethnopharmacology* 109 (1):60-71.
- Ding, S., M. M. Chi, B. P. Scull, R. Rigby, N. M. Schwerbrock, S. Magness, C. Jobin, and P. K. Lund. 2010. "High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse." *PLoS One* 5 (8):e12191. doi: 10.1371/journal.pone.0012191.

- Ding, S., and P. K. Lund. 2011. "Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14 (4):328-33. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283478727.
- Do, M. H., E. Lee, M. J. Oh, Y. Kim, and H. Y. Park. 2018. "High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change." *Nutrients* 10 (6). doi: 10.3390/nu10060761.
- Drazic, A., L. M. Myklebust, R. Ree, and T. Arnesen. 2016. "The world of protein acetylation." *Biochim Biophys Acta* 1864 (10):1372-401. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.007.
- Duda-Chodak, A., T. Tarko, P. Satora, and P. Sroka. 2015. "Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review." *Eur J Nutr* 54 (3):325-41. doi: 10.1007/s00394-015-0852-y.
- Eslamparast, T., P. Tandon, and M. Raman. 2017. "Dietary Composition Independent of Weight Loss in the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Nutrients* 9 (8). doi: 10.3390/nu9080800.
- Esmaeili, M. A., F. Zohari, and H. Sadeghi. 2009. "Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucrium polium* on beta-cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes." *Planta Med* 75 (13):1418-20. doi: 10.1055/s-0029-1185704.
- Etxeberria, U., N. Arias, N. Boqué, M. T. Macarulla, M. P. Portillo, J. A. Martínez, and F. I. Milagro. 2015. "Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats." *J Nutr Biochem* 26 (6):651-60. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.01.002.
- Everard, A., C. Belzer, L. Geurts, J. P. Ouwerkerk, C. Druart, L. B. Bindels, Y. Guiot, et al. 2013. "Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (22):9066-71. doi: 10.1073/pnas.1219451110.
- Fandriks, L. 2017. "Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview." *J Intern Med* 281 (4):319-36. doi: 10.1111/joim.12584.
- Fidler Mis, N., C. Braegger, J. Bronsky, C. Campoy, M. Domellöf, N. D. Embleton, I. Hojsak, et al. 2017. "Sugar in Infants, Children and Adolescents: A Position Paper of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 65 (6):681-96. doi: 10.1097/mpg.0000000000001733.
- Finicelli, M., T. Squillaro, F. Di Cristo, A. Di Salle, M. A. B. Melone, U. Galderisi, and G. Peluso. 2019. "Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives." *J Cell Physiol* 234 (5):5807-26. doi: 10.1002/jcp.27506.
- Fisberg, M., I. Kovalskys, G. Gómez, A. Rigotti, L. Y. C. Sanabria, M. C. Y. García, R. G. P. Torres, et al. 2018. "Total and Added Sugar Intake: Assessment in Eight Latin American Countries." *Nutrients* 10 (4). doi: 10.3390/nu10040389.
- Fraga, C. G., K. D. Croft, D. O. Kennedy, and F. A. Tomás-Barberán. 2019. "The effects of polyphenols and other bioactives on human health." *Food Funct* 10 (2):514-28. doi: 10.1039/c8fo01997e.
- Fraga, C. G., P. I. Oteiza, and M. Galleano. 2018. "Plant bioactives and redox signaling: (-)-Epicatechin as a paradigm." *Mol Aspects Med* 61:31-40. doi: 10.1016/j.mam.2018.01.007.
- França, L. M., C. F. F. Coêlho, L. N. C. Freitas, I. L. S. Souza, V. T. Chagas, V. Debbas, T. M. de Lima, H. P. de Souza, F. R. M. Laurindo, and A. M. A. Paes. 2019. "Syzygium cumini Leaf Extract Reverts Hypertriglyceridemia via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats." *Oxid Med Cell Longev* 2019:9417498. doi: 10.1155/2019/9417498.
- Freidenberg, G. R., D. Reichart, J. M. Olefsky, and R. R. Henry. 1988. "Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss." *J Clin Invest* 82 (4):1398-406. doi: 10.1172/jci113744.
- Furet, J. P., L. C. Kong, J. Tap, C. Poitou, A. Basdevant, J. L. Bouillot, D. Mariat, et al. 2010. "Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers." *Diabetes* 59 (12):3049-57. doi: 10.2337/db10-0253.

- Gao, Z., J. Yin, J. Zhang, R. E. Ward, R. J. Martin, M. Lefevre, W. T. Cefalu, and J. Ye. 2009. "Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice." *Diabetes* 58 (7):1509-17. doi: 10.2337/db08-1637.
- Gill, P. A., M. C. van Zelm, J. G. Muir, and P. R. Gibson. 2018. "Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders." *Aliment Pharmacol Ther* 48 (1):15-34. doi: 10.1111/apt.14689.
- Gill, S. R., M. Pop, R. T. Deboy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett, and K. E. Nelson. 2006. "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome." *Science* 312 (5778):1355-9. doi: 10.1126/science.1124234.
- Giugliano, D., M. I. Maiorino, G. Bellastella, and K. Esposito. 2018. "More sugar? No, thank you! The elusive nature of low carbohydrate diets." *Endocrine* 61 (3):383-7. doi: 10.1007/s12020-018-1580-x.
- Grundny, S. M. 2008. "Metabolic syndrome pandemic." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (4):629-36. doi: 10.1161/atvbaha.107.151092.
- Gwiazdowska, D., K. Juś, J. Jasnowska-Małecka, and K. Kluczyńska. 2015. "The impact of polyphenols on Bifidobacterium growth." *Acta Biochim Pol* 62 (4):895-901. doi: 10.18388/abp.2015\_1154.
- Halberg, N., I. Wernstedt-Asterholm, and P. E. Scherer. 2008. "The adipocyte as an endocrine cell." *Endocrinol Metab Clin North Am* 37 (3):753-68, x-xi. doi: 10.1016/j.ecl.2008.07.002.
- Hannou, S. A., D. E. Haslam, N. M. McKeown, and M. A. Herman. 2018. "Fructose metabolism and metabolic disease." *J Clin Invest* 128 (2):545-55. doi: 10.1172/jci96702.
- Helmstädter, A. 2008. "Syzygium cumini (L.) SKEELS (Myrtaceae) against diabetes--125 years of research." *Pharmazie* 63 (2):91-101.
- Henning, S. M., J. Yang, M. Hsu, R. P. Lee, E. M. Grojean, A. Ly, C. H. Tseng, D. Heber, and Z. Li. 2018. "Decaffeinated green and black tea polyphenols decrease weight gain and alter microbiome populations and function in diet-induced obese mice." *Eur J Nutr* 57 (8):2759-69. doi: 10.1007/s00394-017-1542-8.
- Heymsfield, S. B., and T. A. Wadden. 2017. "Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity." *N Engl J Med* 376 (15):1492. doi: 10.1056/NEJMc1701944.
- Horton, F., J. Wright, L. Smith, P. J. Hinton, and M. D. Robertson. 2014. "Increased intestinal permeability to oral chromium (51 Cr) -EDTA in human Type 2 diabetes." *Diabet Med* 31 (5):559-63. doi: 10.1111/dme.12360.
- Jayakumar, S., and R. Loomba. 2019. "Review article: emerging role of the gut microbiome in the progression of nonalcoholic fatty liver disease and potential therapeutic implications." *Aliment Pharmacol Ther* 50 (2):144-58. doi: 10.1111/apt.15314.
- Jin, J. S., M. Touyama, T. Hisada, and Y. Benno. 2012. "Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to Bifidobacterium species." *Microbiol Immunol* 56 (11):729-39. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00502.x.
- Jocken, J. W. E., M. A. Gonzalez Hernandez, N. T. H. Hoebbers, C. M. van der Beek, Y. P. G. Essers, E. E. Blaak, and E. E. Canfora. 2017. "Short-Chain Fatty Acids Differentially Affect Intracellular Lipolysis in a Human White Adipocyte Model." *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:372. doi: 10.3389/fendo.2017.00372.
- Johnson, R. J., L. G. Sánchez-Lozada, P. Andrews, and M. A. Lanaspa. 2017. "Perspective: A Historical and Scientific Perspective of Sugar and Its Relation with Obesity and Diabetes." *Adv Nutr* 8 (3):412-22. doi: 10.3945/an.116.014654.
- Kannan, M. M., and S. D. Quine. 2013. "Ellagic acid inhibits cardiac arrhythmias, hypertrophy and hyperlipidaemia during myocardial infarction in rats." *Metabolism* 62 (1):52-61. doi: 10.1016/j.metabol.2012.06.003.
- Khan, S., S. Waliullah, V. Godfrey, M. A. W. Khan, R. A. Ramachandran, B. L. Cantarel, C. Behrendt, L. Peng, L. V. Hooper, and H. Zaki. 2020. "Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice." *Sci Transl Med* 12 (567). doi: 10.1126/scitranslmed.aay6218.
- Kim, H. S., M. J. Quon, and J. A. Kim. 2014. "New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate." *Redox Biol* 2:187-95. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.022.

- Kim, S. C., R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, et al. 2006. "Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey." *Mol Cell* 23 (4):607-18. doi: 10.1016/j.molcel.2006.06.026.
- Kitade, H., G. Chen, Y. Ni, and T. Ota. 2017. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments." *Nutrients* 9 (4). doi: 10.3390/nu9040387.
- Koh, A., F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, and F. Backhed. 2016. "From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites." *Cell* 165 (6):1332-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
- Koh, A., F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, and F. Bäckhed. 2016. "From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites." *Cell* 165 (6):1332-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
- Kumar, A, R Ilavarasan, T Jayachandran, M Deecaraman, P Aravindan, N Padmanabhan, and MRV Krishan. 2008. "Anti-diabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats." *Journal of Medicinal Plants Research* 2 (9):246-9.
- Laffin, M., R. Fedorak, A. Zalasky, H. Park, A. Gill, A. Agrawal, A. Keshteli, N. Hotte, and K. L. Madsen. 2019. "A high-sugar diet rapidly enhances susceptibility to colitis via depletion of luminal short-chain fatty acids in mice." *Sci Rep* 9 (1):12294. doi: 10.1038/s41598-019-48749-2.
- Lam, Y. Y., C. W. Ha, C. R. Campbell, A. J. Mitchell, A. Dinudom, J. Oscarsson, D. I. Cook, et al. 2012. "Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice." *PLoS One* 7 (3):e34233. doi: 10.1371/journal.pone.0034233.
- Larraufie, P., C. Martin-Gallausiaux, N. Lapaque, J. Dore, F. M. Gribble, F. Reimann, and H. M. Blottiere. 2018. "SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells." *Sci Rep* 8 (1):74. doi: 10.1038/s41598-017-18259-0.
- Larsen, N., F. K. Vogensen, F. W. van den Berg, D. S. Nielsen, A. S. Andreasen, B. K. Pedersen, W. A. Al-Soud, S. J. Sørensen, L. H. Hansen, and M. Jakobsen. 2010. "Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults." *PLoS One* 5 (2):e9085. doi: 10.1371/journal.pone.0009085.
- Le Roy, T., M. Llopis, P. Lepage, A. Bruneau, S. Rabot, C. Bevilacqua, P. Martin, et al. 2013. "Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice." *Gut* 62 (12):1787-94. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303816.
- Lee, S., K. I. Keirse, R. Kirkland, Z. I. Grunewald, J. G. Fischer, and C. B. de La Serre. 2018. "Blueberry Supplementation Influences the Gut Microbiota, Inflammation, and Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Rats." *J Nutr* 148 (2):209-19. doi: 10.1093/jn/nxx027.
- Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon. 2005. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.
- Ley, R. E., F. Bäckhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon. 2005. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.
- Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, S. Klein, and J. I. Gordon. 2006. "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." *Nature* 444 (7122):1022-3. doi: 10.1038/4441022a.
- Li, X., K. Watanabe, and I. Kimura. 2017. "Gut Microbiota Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases." *Front Immunol* 8:1882. doi: 10.3389/fimmu.2017.01882.
- Liao, C. C., T. T. Ou, C. H. Wu, and C. J. Wang. 2013. "Prevention of diet-induced hyperlipidemia and obesity by caffeic acid in C57BL/6 mice through regulation of hepatic lipogenesis gene expression." *J Agric Food Chem* 61 (46):11082-8. doi: 10.1021/jf4026647.
- Lim, S. S., T. Vos, A. D. Flaxman, G. Danaei, K. Shibuya, H. Adair-Rohani, M. Amann, et al. 2012. "A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet* 380 (9859):2224-60. doi: 10.1016/s0140-6736(12)61766-8.



- Lin, S., Z. Wang, K. L. Lam, S. Zeng, B. K. Tan, and J. Hu. 2019. "Role of intestinal microecology in the regulation of energy metabolism by dietary polyphenols and their metabolites." *Food Nutr Res* 63. doi: 10.29219/fnr.v63.1518.
- Liu, I. M., T. F. Tzeng, S. S. Liou, and T. W. Lan. 2007. "Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats." *Life Sci* 81 (21-22):1479-88. doi: 10.1016/j.lfs.2007.08.045.
- Loomba, R., V. Seguritan, W. Li, T. Long, N. Klitgord, A. Bhatt, P. S. Dulai, et al. 2019. "Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Cell Metab* 30 (3):607. doi: 10.1016/j.cmet.2019.08.002.
- Louis, P., G. L. Hold, and H. J. Flint. 2014. "The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer." *Nat Rev Microbiol* 12 (10):661-72. doi: 10.1038/nrmicro3344.
- Lozupone, C. A., J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, and R. Knight. 2012. "Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota." *Nature* 489 (7415):220-30. doi: 10.1038/nature11550.
- Luca, S. V., I. Macovei, A. Bujor, A. Miron, K. Skalicka-Wozniak, A. C. Aprotosoie, and A. Trifan. 2019. "Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites." *Crit Rev Food Sci Nutr*:1-34. doi: 10.1080/10408398.2018.1546669.
- Mastan, SK, G Chaitanya, T Bhavya Latha, A Srikanth, G Sumalatha, and K Eswar Kumar. 2009. "Cardioprotective effect of methanolic extract of *Syzygium cumini* seeds on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats." *Der Pharmacia Lettre* 1 (1):143-9.
- Masumoto, S., A. Terao, Y. Yamamoto, T. Mukai, T. Miura, and T. Shoji. 2016. "Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes." *Sci Rep* 6:31208. doi: 10.1038/srep31208.
- McCracken, E., M. Monaghan, and S. Sreenivasan. 2018. "Pathophysiology of the metabolic syndrome." *Clin Dermatol* 36 (1):14-20. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.004.
- McFall-Ngai, M., M. G. Hadfield, T. C. Bosch, H. V. Carey, T. Domazet-Lošo, A. E. Douglas, N. Dubilier, et al. 2013. "Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (9):3229-36. doi: 10.1073/pnas.1218525110.
- Menzies, K. J., H. Zhang, E. Katsyuba, and J. Auwerx. 2016. "Protein acetylation in metabolism - metabolites and cofactors." *Nat Rev Endocrinol* 12 (1):43-60. doi: 10.1038/nrendo.2015.181.
- Meyer, J. G., S. Softic, N. Basisty, M. J. Rardin, E. Verdin, B. W. Gibson, O. Ilkayeva, C. B. Newgard, C. R. Kahn, and B. Schilling. 2018. "Temporal dynamics of liver mitochondrial protein acetylation and succinylation and metabolites due to high fat diet and/or excess glucose or fructose." *PLoS One* 13 (12):e0208973. doi: 10.1371/journal.pone.0208973.
- Miller, J. M., M. B. Kaylor, M. Johannsson, C. Bay, and J. R. Churilla. 2014. "Prevalence of metabolic syndrome and individual criterion in US adolescents: 2001-2010 National Health and Nutrition Examination Survey." *Metab Syndr Relat Disord* 12 (10):527-32. doi: 10.1089/met.2014.0055.
- Moreira, A. P., T. F. Teixeira, A. B. Ferreira, C. Peluzio Mdo, and C. Alfenas Rde. 2012. "Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia." *Br J Nutr* 108 (5):801-9. doi: 10.1017/s0007114512001213.
- Moreno-Indias, I., L. Sanchez-Alcoholado, P. Perez-Martinez, C. Andres-Lacueva, F. Cardona, F. Tinahones, and M. I. Queipo-Ortuno. 2016. "Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients." *Food Funct* 7 (4):1775-87. doi: 10.1039/c5fo00886g.
- Moreno-Indias, I., L. Sánchez-Alcoholado, P. Pérez-Martínez, C. Andrés-Lacueva, F. Cardona, F. Tinahones, and M. I. Queipo-Ortuño. 2016. "Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients." *Food Funct* 7 (4):1775-87. doi: 10.1039/c5fo00886g.
- Neyrinck, A. M., V. F. Van Hée, L. B. Bindels, F. De Backer, P. D. Cani, and N. M. Delzenne. 2013. "Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota." *Br J Nutr* 109 (5):802-9. doi: 10.1017/s0007114512002206.

- Nolan, P. B., G. Carrick-Ranson, J. W. Stinear, S. A. Reading, and L. C. Dalleck. 2017. "Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis." *Prev Med Rep* 7:211-5. doi: 10.1016/j.pmedr.2017.07.004.
- O'Neill, S., and L. O'Driscoll. 2015. "Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies." *Obes Rev* 16 (1):1-12. doi: 10.1111/obr.12229.
- Organization, World Health. 2015. *Guideline: sugars intake for adults and children*: World Health Organization.
- Ozidal, T., D. A. Sela, J. Xiao, D. Boyacioglu, F. Chen, and E. Capanoglu. 2016. "The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility." *Nutrients* 8 (2):78. doi: 10.3390/nu8020078.
- Patel, S. S., R. S. Shah, and R. K. Goyal. 2009. "Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of Dihar, a polyherbal ayurvedic formulation in streptozotocin induced diabetic rats." *Indian J Exp Biol* 47 (7):564-70.
- Paun, A., C. Yau, and J. S. Danska. 2017. "The Influence of the Microbiome on Type 1 Diabetes." *J Immunol* 198 (2):590-5. doi: 10.4049/jimmunol.1601519.
- Petersen, M. C., and G. I. Shulman. 2018. "Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance." *Physiol Rev* 98 (4):2133-223. doi: 10.1152/physrev.00063.2017.
- Psichas, A., M. L. Sleeth, K. G. Murphy, L. Brooks, G. A. Bewick, A. C. Hanyaloglu, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, and G. Frost. 2015. "The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents." *Int J Obes (Lond)* 39 (3):424-9. doi: 10.1038/ijo.2014.153.
- Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, et al. 2010. "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." *Nature* 464 (7285):59-65. doi: 10.1038/nature08821.
- Qin, J., Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang, S. Liang, et al. 2012. "A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes." *Nature* 490 (7418):55-60. doi: 10.1038/nature11450.
- Queipo-Ortuño, M. I., M. Boto-Ordóñez, M. Murri, J. M. Gomez-Zumaquero, M. Clemente-Postigo, R. Estruch, F. Cardona Diaz, C. Andrés-Lacueva, and F. J. Tinahones. 2012. "Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers." *Am J Clin Nutr* 95 (6):1323-34. doi: 10.3945/ajcn.111.027847.
- Ramya, S, K Neethirajan, and R Jayakumararaj. 2012. "Profile of bioactive compounds in *Syzygium cumini*—a review." *J. Pharm. Res* 5 (8):4548-53.
- Rau, M., A. Rehman, M. Dittrich, A. K. Groen, H. M. Hermanns, F. Seyfried, N. Beyersdorf, T. Dandekar, P. Rosenstiel, and A. Geier. 2018. "Fecal SCFAs and SCFA-producing bacteria in gut microbiome of human NAFLD as a putative link to systemic T-cell activation and advanced disease." *United European Gastroenterol J* 6 (10):1496-507. doi: 10.1177/2050640618804444.
- Ravi, K, S Rajasekaran, and S Subramanian. 2003. "Hypoglycemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernels on streptozotocin-induced diabetes in rats." *Pharmaceutical biology* 41 (8):598-603.
- Ravi, K., S. Rajasekaran, and S. Subramanian. 2005. "Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats." *Food Chem Toxicol* 43 (9):1433-9. doi: 10.1016/j.fct.2005.04.004.
- Reaven, G. M. 1988. "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." *Diabetes* 37 (12):1595-607. doi: 10.2337/diab.37.12.1595.
- Rekha, Namasivayam, Ramachandran Balaji, and Munuswamy Decaraman. 2008. "Effect of aqueous extract of *Syzygium cumini* pulp on antioxidant defense system in streptozotocin induced diabetic rats." *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 7 (2):137-0.
- Riehle, C., and E. D. Abel. 2016. "Insulin Signaling and Heart Failure." *Circ Res* 118 (7):1151-69. doi: 10.1161/circresaha.116.306206.
- Roberts, C. K., A. L. Hevener, and R. J. Barnard. 2013. "Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training." *Compr Physiol* 3 (1):1-58. doi: 10.1002/cphy.c110062.

- Rochlani, Y., N. V. Pothineni, S. Kovelamudi, and J. L. Mehta. 2017. "Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds." *Ther Adv Cardiovasc Dis* 11 (8):215-25. doi: 10.1177/1753944717711379.
- Ruiz, A. G., F. Casafont, J. Crespo, A. Cayón, M. Mayorga, A. Estebanez, J. C. Fernandez-Escalante, and F. Pons-Romero. 2007. "Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF- $\alpha$  gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." *Obes Surg* 17 (10):1374-80. doi: 10.1007/s11695-007-9243-7.
- Samuel, V. T., and G. I. Shulman. 2012. "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." *Cell* 148 (5):852-71. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.017.
- . 2016. "The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux." *J Clin Invest* 126 (1):12-22. doi: 10.1172/jci77812.
- Sanches, J. R., L. M. França, V. T. Chagas, R. S. Gaspar, K. A. Dos Santos, L. M. Gonçalves, D. M. Sloboda, et al. 2016. "Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats." *Front Pharmacol* 7:48. doi: 10.3389/fphar.2016.00048.
- Satokari, R. 2020. "High Intake of Sugar and the Balance between Pro- and Anti-Inflammatory Gut Bacteria." *Nutrients* 12 (5). doi: 10.3390/nu12051348.
- Schoenfelder, Tatiana, Carolini Z Warmlin, Michele S Manfredini, Larissa L Pavei, Juana V Réus, Taciane C Tristão, Marcelo S Fernandes, and Luciane Costa-Campos. 2010. "Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae. in diabetic rats." *Revista Brasileira de farmacognosia* 20 (2):222-7.
- Schossler, Deila Rosély C, Cinthia Melazzo Mazzanti, Sônia Cristina Almeida da Luz, Andreane Filappi, Danívia Prestes, Aron Ferreira da Silveira, and Marcelo Cecim. 2004. "Syzygium cumini and the regeneration of insulin positive cells from the pancreatic duct." *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 41 (4):236-9.
- Schwer, B., M. Eckersdorff, Y. Li, J. C. Silva, D. Fermin, M. V. Kurtev, C. Giallourakis, M. J. Comb, F. W. Alt, and D. B. Lombard. 2009. "Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation." *Aging Cell* 8 (5):604-6. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00503.x.
- Schwartz, A., D. Taras, K. Schafer, S. Beijer, N. A. Bos, C. Donus, and P. D. Hardt. 2010. "Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects." *Obesity (Silver Spring)* 18 (1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167.
- Sharma, Bhavna, Chandrajeet Balomajumder, and Partha Roy. 2008. "Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats." *Food and chemical toxicology* 46 (7):2376-83.
- Sharma, Bhavna, G Viswanath, Rajani Salunke, and Partha Roy. 2008. "Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice." *Food chemistry* 110 (3):697-705.
- Sharma, S., and P. Tripathi. 2019. "Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go?" *J Nutr Biochem* 63:101-8. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.10.003.
- Silva, Selma do N, Iracelle C Abreu, Graciela Fernanda C Silva, Rachel M Ribeiro, Adelson de S Lopes, Maria do Socorro de S Cartágenes, Sônia Maria de F Freire, Antônio Carlos R Borges, and Marilene Oliveira da R Borges. 2012. "The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents." *Revista Brasileira de farmacognosia* 22 (1):102-8.
- Sobrecases, H., K. A. Lê, M. Bortolotti, P. Schneiter, M. Ith, R. Kreis, C. Boesch, and L. Tappy. 2010. "Effects of short-term overfeeding with fructose, fat and fructose plus fat on plasma and hepatic lipids in healthy men." *Diabetes Metab* 36 (3):244-6. doi: 10.1016/j.diabet.2010.03.003.
- Softic, S., J. G. Meyer, G. X. Wang, M. K. Gupta, T. M. Batista, Hpm Lauritzen, S. Fujisaka, et al. 2019. "Dietary Sugars Alter Hepatic Fatty Acid Oxidation via Transcriptional and Post-translational Modifications of Mitochondrial Proteins." *Cell Metab* 30 (4):735-53.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2019.09.003.
- Srivastava, Shalini, and Deepak Chandra. 2013. "Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 (9):2084-93.

- Steensels, S., J. Qiao, Y. Zhang, K. M. Maner-Smith, N. Kika, C. D. Holman, K. E. Corey, W. C. Bracken, E. A. Ortlund, and B. A. Ersoy. 2020. "Acyl-Coenzyme A Thioesterase 9 Traffics Mitochondrial Short-Chain Fatty Acids Toward De Novo Lipogenesis and Glucose Production in the Liver." *Hepatology* 72 (3):857-72. doi: 10.1002/hep.31409.
- Stefanello, Maria Élide Alves, Aislan CRF Pascoal, and Marcos J Salvador. 2011. "Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties." *Chemistry & biodiversity* 8 (1):73-94.
- "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." 2012. *Nature* 486 (7402):207-14. doi: 10.1038/nature11234.
- Tamburini, S., N. Shen, H. C. Wu, and J. C. Clemente. 2016. "The microbiome in early life: implications for health outcomes." *Nat Med* 22 (7):713-22. doi: 10.1038/nm.4142.
- Tan, J., C. McKenzie, M. Potamitis, A. N. Thorburn, C. R. Mackay, and L. Macia. 2014. "The role of short-chain fatty acids in health and disease." *Adv Immunol* 121:91-119. doi: 10.1016/b978-0-12-800100-4.00003-9.
- Taskinen, M. R., and J. Borén. 2015. "New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes." *Atherosclerosis* 239 (2):483-95. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.039.
- Tchkonia, T., T. Thomou, Y. Zhu, I. Karagiannides, C. Pothoulakis, M. D. Jensen, and J. L. Kirkland. 2013. "Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots." *Cell Metab* 17 (5):644-56. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.008.
- Ter Horst, K. W., and M. J. Serlie. 2017. "Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Nutrients* 9 (9). doi: 10.3390/nu9090981.
- Tolhurst, G., H. Heffron, Y. S. Lam, H. E. Parker, A. M. Habib, E. Diakogiannaki, J. Cameron, J. Grosse, F. Reimann, and F. M. Gribble. 2012. "Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2." *Diabetes* 61 (2):364-71. doi: 10.2337/db11-1019.
- Tomás-Barberán, F. A., M. V. Selma, and J. C. Espín. 2016. "Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 19 (6):471-6. doi: 10.1097/mco.0000000000000314.
- "Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants." 2016. *Lancet* 387 (10026):1377-96. doi: 10.1016/s0140-6736(16)30054-x.
- Tripathi, A. K., and S. Kohli. 2014. "Pharmacognostical standardization and antidiabetic activity of *Syzygium cumini* (Linn.) barks (Myrtaceae) on streptozotocin-induced diabetic rats." *J Complement Integr Med* 11 (2):71-81. doi: 10.1515/jcim-2014-0011.
- Tripathi, P., R. Tripathi, R. K. Patel, and S. S. Pancholi. 2013. "Investigation of antimutagenic potential of *Foeniculum vulgare* essential oil on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice." *Drug Chem Toxicol* 36 (1):35-41. doi: 10.3109/01480545.2011.648328.
- Tsao, R. 2010. "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols." *Nutrients* 2 (12):1231-46. doi: 10.3390/nu2121231.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. Hamady, C. M. Fraser-Liggett, R. Knight, and J. I. Gordon. 2007. "The human microbiome project." *Nature* 449 (7164):804-10. doi: 10.1038/nature06244.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon. 2006. "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." *Nature* 444 (7122):1027-31. doi: 10.1038/nature05414.
- Ulla, A., M. A. Alam, B. Sikder, F. A. Sumi, M. M. Rahman, Z. F. Habib, M. K. Mohammed, N. Subhan, H. Hossain, and H. M. Reza. 2017. "Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats." *BMC Complement Altern Med* 17 (1):289. doi: 10.1186/s12906-017-1799-8.
- Vallianou, N., T. Stratigou, G. S. Christodoulatos, and M. Dalamaga. 2019. "Understanding the Role of the Gut Microbiome and Microbial Metabolites in Obesity and Obesity-Associated Metabolic Disorders: Current Evidence and Perspectives." *Curr Obes Rep* 8 (3):317-32. doi: 10.1007/s13679-019-00352-2.

- van der Beek, C. M., E. E. Canfora, K. Lenaerts, F. J. Troost, Swmo Damink, J. J. Holst, A. A. M. Masclee, C. H. C. Dejong, and E. E. Blaak. 2016. "Distal, not proximal, colonic acetate infusions promote fat oxidation and improve metabolic markers in overweight/obese men." *Clin Sci (Lond)* 130 (22):2073-82. doi: 10.1042/cs20160263.
- Verdin, E., and M. Ott. 2015. "50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* 16 (4):258-64. doi: 10.1038/nrm3931.
- VIGITEL, Brasil. 2019. "vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis." *Brasília: Ministério da Saúde*.
- Villalpando-Arteaga, E. V., E. Mendieta-Condado, H. Esquivel-Solís, A. A. Canales-Aguirre, F. J. Gálvez-Gastélum, J. C. Mateos-Díaz, J. A. Rodríguez-González, and A. L. Márquez-Aguirre. 2013. "Hibiscus sabdariffa L. aqueous extract attenuates hepatic steatosis through down-regulation of PPAR- $\gamma$  and SREBP-1c in diet-induced obese mice." *Food Funct* 4 (4):618-26. doi: 10.1039/c3fo30270a.
- Wang, J., L. Tang, H. Zhou, J. Zhou, T. C. Glenn, C. L. Shen, and J. S. Wang. 2018. "Long-term treatment with green tea polyphenols modifies the gut microbiome of female sprague-dawley rats." *J Nutr Biochem* 56:55-64. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.01.005.
- Wang, L., B. Zeng, Z. Liu, Z. Liao, Q. Zhong, L. Gu, H. Wei, and X. Fang. 2018. "Green Tea Polyphenols Modulate Colonic Microbiota Diversity and Lipid Metabolism in High-Fat Diet Treated HFA Mice." *J Food Sci* 83 (3):864-73. doi: 10.1111/1750-3841.14058.
- Wein, S., N. Behm, R. K. Petersen, K. Kristiansen, and S. Wolfram. 2010. "Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR-gamma independent mechanism." *Eur J Pharm Sci* 41 (1):16-22. doi: 10.1016/j.ejps.2010.05.004.
- Wittekind, A., and J. Walton. 2014. "Worldwide trends in dietary sugars intake." *Nutr Res Rev* 27 (2):330-45. doi: 10.1017/s0954422414000237.
- "Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults." 2017. *Lancet* 390 (10113):2627-42. doi: 10.1016/s0140-6736(17)32129-3.
- Xiao, S., N. Fei, X. Pang, J. Shen, L. Wang, B. Zhang, M. Zhang, et al. 2014. "A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome." *FEMS Microbiol Ecol* 87 (2):357-67. doi: 10.1111/1574-6941.12228.
- Yamashita, H., K. Fujisawa, E. Ito, S. Idei, N. Kawaguchi, M. Kimoto, M. Hiemori, and H. Tsuji. 2007. "Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats." *Biosci Biotechnol Biochem* 71 (5):1236-43. doi: 10.1271/bbb.60668.
- Yatsunencko, T., F. E. Rey, M. J. Manary, I. Trehan, M. G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, et al. 2012. "Human gut microbiome viewed across age and geography." *Nature* 486 (7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053.
- Zhang, D. M., R. Q. Jiao, and L. D. Kong. 2017. "High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions." *Nutrients* 9 (4). doi: 10.3390/nu9040335.
- Zhang, L., S. Pagoto, C. May, B. Olendzki, L. Tucker K, C. Ruiz, Y. Cao, and Y. Ma. 2018. "Effect of AHA dietary counselling on added sugar intake among participants with metabolic syndrome." *Eur J Nutr* 57 (3):1073-82. doi: 10.1007/s00394-017-1390-6.
- Zheng, C. J., R. Liu, B. Xue, J. Luo, L. Gao, Y. Wang, S. Ou, S. Li, and X. Peng. 2017. "Impact and consequences of polyphenols and fructooligosaccharide interplay on gut microbiota in rats." *Food Funct* 8 (5):1925-32. doi: 10.1039/c6fo01783e.
- Zhu, L., S. S. Baker, C. Gill, W. Liu, R. Alkhoury, R. D. Baker, and S. R. Gill. 2013. "Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH." *Hepatology* 57 (2):601-9. doi: 10.1002/hep.26093.

