



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KELLY CRISTIANE GABRIEL DE ALMEIDA

**EFEITO DO INIBIDOR DE BOMBA DE PROTONS PANTOPRAZOL SOBRE A
MICROBIOTA INTESTINAL E A INSTALAÇÃO DE DOENÇA HEPÁTICA
GORDUROSA NÃO-ALCOOLICA EM CAMUNDONGOS.**

CAMPINAS
2022

KELLY CRISTIANE GABRIEL DE ALMEIDA

EFEITO DO INIBIDOR DE BOMBA DE PROTONS PANTOPRAZOL SOBRE A
MICROBIOTA INTESTINAL E A INSTALAÇÃO DE DOENÇA HEPÁTICA
GORDUOSA NÃO-ALCOOLICA EM CAMUNDONGOS.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestra em Ciências na área de Clínica
Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA KELLY CRISTIANE GABRIEL DE ALMEIDA
E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD.

CAMPINAS
2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

AL64e Almeida, Kelly Cristiane Gabriel, 1995-
Efeito do inibidor de bomba de prótons pantoprazol sobre a microbiota intestinal e a instalação de doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos. / Kelly Cristiane Gabriel de Almeida. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Mario José Abdalla Saad.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 2. Inibidor da bomba de prótons. 3. Microbiota intestinal. I. Saad, Mario José Abdalla, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Effect of the proton pump inhibitor pantoprazole on the intestinal microbiota and the onset on non-alcoholic fatty liver disease in mice.

Palavras-chave em inglês:

Non-alcoholic fatty liver disease

Proton pump inhibitors

Gastrointestinal microbiome

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Mario Jose Abdalla Saad

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Leonardo Oliveira Reis

Data de defesa: 24-11-2022

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9297-3621>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5076107956726416>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
KELLY CRISTIANE GABRIEL DE ALMEIDA

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

2. PROF. DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS

3. PROFA. DRA. CARLA ROBERTA DE OLIVEIRA CARVALHO

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-seno SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 24/11/2022

DEDICATÓRIA

Dedico com amor este trabalho à minha mãe Sônia, e as minhas filhas Stella e Helena, que são a inspiração para todas as minhas conquistas. Amo vocês incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, e por nunca ter me deixado desistir dos meus sonhos mesmo diante das dificuldades.

A minha família, por estarem ao meu lado durante esta trajetória, por confiarem em mim e me motivarem.

A minha mãe, que foi minha base durante esse ciclo, que renunciou muitas coisas para que pudesse me ajudar no desenvolvimento da pesquisa, que foi mãe das minhas filhas durante minhas ausências, não deixando faltar amor e cuidado, e que não me deixou desistir na trajetória, essa conquista é nossa.

As minhas filhas, Stella e Helena, que mesmo tão pequenas compreenderam minhas ausências, elas que são minha inspiração para todas as minhas conquistas e que mesmo sem entender me ajudaram a me fortalecer nos momentos de fraqueza, tudo que eu faço é por vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Jose Abdalla Saad o meu apreço e admiração, por acreditar em minha capacidade e pela orientação ao longo da pesquisa, por me receber em seu laboratório, e por ser esse ser humano íntegro, sempre muito positivo e confiante.

Agradeço a Dioze, Heloísa e Andrey, pelo exemplo de profissionalismo, e por me auxiliarem todas as vezes em que precisei. A vocês, gratidão.

Agradeço aos colegas do grupo, que compartilharam desta jornada comigo e por todas as experiências compartilhadas.

E a todos que fazem parte desta linda caminhada: Está aqui, consegui.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

**“Acredite que você pode.
Assim você já está no meio do caminho”.**

Theodore Rooseve

RESUMO

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) são um dos medicamentos mais prescritos em todo o mundo. Os IBP's induzem a modulação da microbiota semelhante a modelos animais de obesidade e obesidade humana, sem a presença de dieta hiperlipídica, ou mesmo ganho de massa corporal. Assim acreditamos que seja um modelo interessante para correlacionar a modulação da microbiota com o estabelecimento da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. No presente estudo, investigamos o efeito do tratamento com IBP por 60 dias na sinalização de Toll-like Receptor 4 (TLR-4) e na histologia hepática, a fim de comparar a modulação da microbiota com alguns aspectos da DHGNA ou Esteato-hepatite Não Alcoólica (NASH). Realizamos Teste de Tolerância a Glicose (GTT), dosagem de Lipopolissacarídeos sérico (LPS), Teste de tolerância à Insulina (ITT), extração de fígado para uso em histologia e Western blot, e intestino para Western Blotting e PCR. A microbiota foi investigada por metagenômica. Observamos nos camundongos tratados por 60 dias, uma diminuição da glicemia de jejum, e aumentada sensibilidade a insulina, medido pela constante de decaimento da glicemia (Kitt). Como esperado, o IBP induziu mudança na modulação da microbiota, que foi associada a alterações na integridade do epitélio intestinal na região do íleo. A análise hepática identificou presença de fibrose nos cortes histológicos e aumento na expressão proteica de TGF β , via o tratamento crônico por 60 dias com IBP, além de modular a microbiota sem presença de resistência a insulina, promoveu o aumento nos níveis circulantes de LPS e aumento na sinalização *downstream* de TLR4 e TGF β . Estes dados podem ter papel importante no aumento da esteatose microvesicular e fibrose. Finalmente, este modelo de modulação na microbiota induzidas por IBP pode ser útil para investigar a sua relação com o surgimento de DHGNA.

Palavras-chave: Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica, Inibidor de Bomba de Prótons, Microbiota Intestinal.

ABSTRACT

Proton pump inhibitors (PPIs) are one of the most prescribed drugs worldwide. PPIs induce microbiota modulation similar to animal models of obesity and human obesity, without the presence of a high-fat diet or even body mass gain. Thus, we believe that it is an interesting model to correlate the modulation of the microbiota with the establishment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In the present study, we investigated the effect of PPI treatment for 60 days on Toll-like Receptor 4 (TLR-4) signaling and liver histology, in order to compare the microbiota modulation with some aspects of NAFLD or Non-steatohepatitis Alcoholic (NASH). We performed a Glucose Tolerance Test (GTT), serum Lipopolysaccharide (LPS) dosage, Insulin Tolerance Test (ITT), liver extraction for use in histology and Western blot, and intestine for Western Blotting and PCR. The microbiota was investigated by metagenomics. We observed in mice treated for 60 days, a decrease in fasting glycemia and an increase in insulin sensitivity, measured by the glycemia decay constant (Kitt). As expected, PPI induced changes in the microbiota modulation, which was associated with changes in the integrity of the intestinal epithelium in the ileum region. Liver analysis identified the presence of fibrosis in histological sections and an increase in the protein expression of TGF β , via chronic treatment for 60 days with PPI, in addition to modulating the microbiota without the presence of insulin resistance, it promoted an increase in circulating levels of LPS and an increase in the downstream signaling of TLR4 and TGF β . These data may play an important role in the increase in microvesicular steatosis and fibrosis. Finally, this model of PPI-induced microbiota modulation may be useful to investigate its relationship with the onset of NAFLD.

Keywords: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Proton Pump Inhibitor, Intestinal Microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Microbiota Intestinal e Inflamação	17
FIGURA 2: Estruturas moleculares dos IBPs comercializados no Brasil.....	20
FIGURA 3: Esquemática da ativação do pró-droga no canalículo da célula parietal, seguido da inibição irreversível da bomba H^+,K^+ ATPase pelo IBP ativo. (a) IBP passa da corrente sangüínea para os canalículos da célula parietal (b) protonação do IBP (c) modificação de sua estrutura química para um derivado sulfonamida e posterior ligação com a bomba H^+,K^+ ATPase.....	20
FIGURA 4: Supressão do ácido gástrico e a doença hepática alcoólica.....	24
FIGURA 5: Estrutura do LPS	25
FIGURA 6: Desenho experimental dos animais.....	29
FIGURA 7: Resumo gráfico do artigo.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADIPO	Adiponectina
AGL	Ácidos graxos livres
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
AST	Aspartato aminotransferase
AST	Alanina aminotransferase
CK-18	Fragmento CK-18
CT	Colesterol total
DRGE	Doença do refluxo gástrico esofágico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EH	Esteatose hepática
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
GGT	Gama glutamiltransferase
GLP2R	Receptor de peptídeo 2
GTT	Teste de tolerância a glicose
HCL	Ácido clorídrico
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HSC	Hepatic stellate cell
IBP's	Inibidores de bomba de protons
IKKβ	Subunidade β da cinase inibidora do fator nuclear kappa-B
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IRF3	Fator regulador do interferon 3
IMC	Índice de massa corporal
ITT	Teste de tolerância a insulina
JNK	c-Jun cinase terminal NH ₂
LDL- C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease

ORO	Oil red
RE	Real expression.
RI	Resistência insulínica
SRI	Síndrome de resistência Insulínica
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1
TG	Triglicerídeos
TGI	Trato gastrointestinal
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta
TLR-4	Toll like receptor-4
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PPI	Prótons pump inhibitors
PS	Picrosirius
VLDL-C	Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Microbiota Intestinal	16
2 Fisiologia Gástrica.....	18
2.1 Inibidores de Bomba de Prótons	20
2.2 Pantoprazol	22
2.3 Inibidores de Bomba de Prótons e Microbiota Intestinal.....	22
2.4 Mucinas e Microbiota Intestinal.....	23
2.5 Inibidores de Bomba de Prótons e Doença Hepática	24
2.6 Lipopolissacarídeo (LPS)	25
3 HIPÓTESE	27
4 OBJETIVOS	28
5 METODOLOGIA.....	29
6 RESULTADOS	38
7 DISCUSSÃO	69
8 CONCLUSÃO.....	73
9 REFERÊNCIAS.....	74
10 APÊNDICES.....	81
11 ANEXOS	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

A doença hepática gordurosa não alcoólica está aumentando nos países ocidentais, sendo a cirrose hepática a 12º causa de morte em todo o mundo. Este aumento se deve em parte ao crescimento de casos de obesidade, um fator importante associado a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e a esteato-hepatite (NASH)(1).

A DHGNA tem como características o acúmulo de triglicerídeos no fígado, incluindo um espectro de achados histopatológicos, que podem variar do fígado gorduroso a esteato-hepatite não alcoólica (NASH), fibrose e cirrose, podendo evoluir para carcinoma hepatocelular.

A DHGNA é histologicamente determinada pela presença de esteatose hepática superior a porcentagem 5% do peso do fígado ou quando mais de 5% deste apresenta lipídeos visíveis (2). De acordo com o Índice de Massa Corporal, esse predomínio aumenta (3), estando associada a diversas patologias, como a resistência à insulina, diabetes tipo 2 (DM2), doença coronariana, dislipidemias e hipertensão, sendo caracterizada atualmente como o fenótipo hepático da síndrome metabólica (4).

A DHGNA é uma condição clínico patológica encontrada de maneira comum, sendo definida pelo acúmulo de lipídeos no parênquima hepático de indivíduos que negam o consumo excessivo de álcool, podendo essa condição evoluir para esteato-hepatite não alcoólica, apresentando características como necroinflamação, evoluindo sucessivamente para cirrose, e eventualmente para carcinoma hepático (5).

Nos Estados Unidos há alta prevalência, conforme demonstra informes recentes do “*Center for Disease Control and Prevention*” (CDC), 66% dos adultos apresentam sobrepeso, e destes, metade são obesos. (8) Estimativas indicam ainda que essa porcentagem pode chegar a 45% em 2025 (6).

O aumento da dominância dos fatores de risco, contribui para um aumento de DHGNA mundialmente, sendo mencionada como a doença hepática crônica mais comum entre americanos e adultos (7).

Nos Estados Unidos, há a estimativa de que 36% da população americana apresentem DHGNA, sendo este risco sobreposto para 95% em

obesos e 70% em diabéticos tipo 2 (8). A predisposição genética é um contribuinte importante no desenvolvimento da DHGNA (9), fatores como distribuição da massa adiposa e sexo e idade também são importantes. Estudos apontam ainda, que mulheres em idade fértil são menos afetadas que os homens, porém essa diferença se perde na pós-menopausa (10).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2025 a estimativa é de que 2,3 bilhões de adultos ao redor do mundo estejam acima do peso. No Brasil, segundo um levantamento feito pelo IBGE em 2019, estima-se de que cerca de 96 milhões de brasileiros estivessem acima do peso. De acordo com o Instituto Brasileiro de Fígado (IBRAFIG) a gordura no fígado está presente em 30% dos brasileiros, onde 1% destes pacientes podem evoluir de forma grave, considerando 1% em 30% da população que conta com 214 milhões de habitantes (2021), é um número que preocupa.

O mecanismo de patogênese da DHGNA não é totalmente compreendido, entretanto sabe-se que sua origem é multi-fatorial (11) e compreende o acúmulo de lipídeos hepático, além de estresse oxidativo, características de inflamação e morte celular (12). No momento a teoria mais aceita para explicar a evolução da doença e caracterização da Esteato- Hepatite Não Alcoólica (EHNA), é intitulada de *“two hits”*. Essa teoria foi proposta Day e James. De acordo com esses autores o estímulo inicial (*“first hit”*) seria o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos causado, por exemplo, pela resistência à insulina.

A esteatose hepática pertinente à obesidade está de modo direto relacionada ao aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuição de citocinas anti-inflamatórias (13). A citocina pró-inflamatória (TNF α), é um fator de necrose tumoral, secretada por macrófagos do tecido adiposo e do fígado, está frequentemente relacionada à resistência à insulina e à progressão de NAFLD para NASH (14).

O Fator de necrose tumoral TNF α é responsável pela regulação da inflamação, metabolismo, viabilidade celular e produção de outras citocinas (15), induzindo morte celular com ativação de caspase 3 (16). Estudos comprovam a atuação do TNF α para além da lipotoxicidade hepática causada por aumento de AG, mas como um influenciador desse acúmulo de lipídeo. Endo e colaboradores (38), demonstraram que o fator de necrose tumoral TNF α influencia a esteatose em camundongos por aumentar a expressão de *Sterol regulatory element-binding transcription factor 1* (SREBP-1c). Ademais, o estudo demonstrou que o tratamento contra TNF α utilizando anticorpos, reduziu o conteúdo de lipídeo

no tecido hepático de modelo experimental obeso (ob/ob) utilizando dieta hiperlipídica (17).

Em contraposição ao $\text{TNF}\alpha$, a adiponectina, citocina anti-inflamatória que é produzida pelo tecido adiposo que, está contrariamente relacionada com a obesidade, sendo conhecida por aumentar a sensibilidade à insulina, ativando a via da AMPK e estimulando a utilização de glicose (18).

Além de promover a oxidação de AG (19), os níveis de adiponectina encontram-se reduzidos em pacientes com NAFLD (20). Deste modo, o equilíbrio entre $\text{TNF}\alpha$ e adiponectina é um fator importante no desenvolvimento da NASH (26).

1.2 Microbiota Intestinal

O intestino humano possui um grande número de microrganismos, estes formam a microbiota intestinal. Dentre vários microrganismos da microbiota há bactérias anaeróbias que chegam a corresponder a um número de 500 a 1.000 espécies. Há estimativas que os genomas coletivos como o microbioma intestinal contenham 100 vezes mais genes do que nosso próprio genoma humano. A microbiota intestinal contribui para a nossa homeostase, portanto suas funções são múltiplas e extremamente diversificadas.

A distribuição bacteriana no trato gastrointestinal varia de acordo com a região e é influenciada pelo pH, oxigênio e disponibilidade de nutrientes (21,22).

Assim, tem ficado cada vez mais claro que a microbiota intestinal apresenta um papel importante na fisiologia intestinal e manutenção da saúde do hospedeiro. Produz grande número de enzimas envolvidas na capacidade de extrair energia da dieta do hospedeiro e depositar energia na forma de estoque de gordura (23). Entretanto este mecanismo é dependente de um balanço entre os microrganismos patogênicos e os microrganismos não- patogênicos para promover a saúde (24).

A microbiota intestinal de cada indivíduo é única, sendo parte dela geneticamente definida e parte podendo ser modificada através de via de parto, aleitamento materno, hábitos alimentares, idade e uso de antibióticos. Após o nascimento, o intestino começa a ser colonizado por bactérias, e evidências científicas indicam que a manutenção da saúde está ligada à uma microbiota

equilibrada e diversidade de seus microrganismos, através da sua atuação na digestão de alimentos, regulação energética, síntese de vitaminas, produção de ácidos graxos de cadeia curta, e ainda proteção contra patógenos e regulação do sistema imune (25).

Embora muitas questões sobre a microbiota intestinal ainda não tenham sido respondidas, sabe-se que a microbiota exerce um papel diferente no metabolismo. A microbiota é capaz de colaborar para melhorar a extração de energia dos alimentos, (26) modula os níveis plasmáticos de lipopolissacarídeos (LPS), os quais podem iniciar uma inflamação crônica de baixo grau, (27) (Figura 1), levando ao desenvolvimento de obesidade e diabetes tipo 2 assim como modular alguns genes e proteínas do hospedeiro que regulam o estoque e gasto energético (28).

Estudos recentes demonstram que Bacteroidetes e Firmicutes representam mais de 90% de todos os filotipos das bactérias. Além disso, mais de 90% das bactérias que compõem a microbiota intestinal de humanos e camundongos são anaeróbios estritos, sendo as espécies predominantes: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, entre outros (29).

A colonização intestinal começa logo após o nascimento e é mediada pelo tipo de parto, pela dieta infantil, pelos níveis de higiene e uso de medicamentos (30). Evidentemente, a dieta é um fator chave que regula a sequência e a natureza da colonização. Enterobactérias e bifidobactérias são os primeiros colonizadores, embora ocorram diferenças na composição da microbiota intestinal entre crianças alimentadas com leite materno e com fórmulas infantis. Nestes lactentes, que foram alimentados com leite materno, *Bifidobacterium* é o microrganismo primário e a microflora produz ainda quantidades elevadas de acetato e lactato que restringe o crescimento de patógenos potenciais tais como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (31).

Nos últimos anos inúmeros estudos revelaram o papel da microbiota intestinal no desenvolvimento de doenças metabólicas, entre elas diabetes tipo 1 e 2, obesidade, doenças cardiovasculares e doenças hepáticas crônicas. (32).

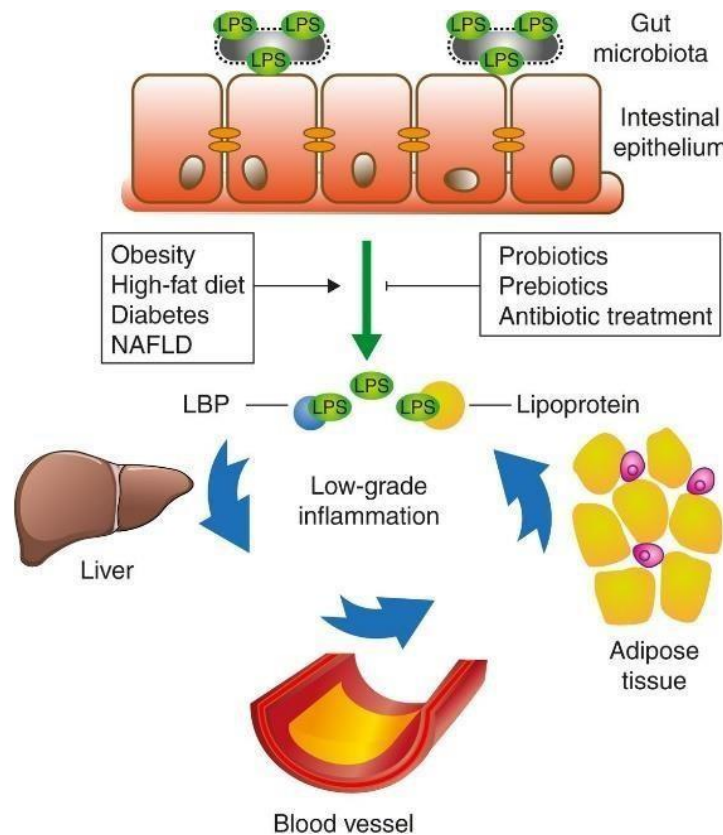


Figura 1. Microbiota intestinal e inflamação. O epitélio intestinal é uma barreira eficiente que impede a absorção de LPS derivado da microbiota intestinal. Obesidade, dieta rica em gordura, DHGNA, e diabetes estão associados a maior permeabilidade intestinal levando a endotoxemia metabólica. Probióticos, prebióticos, e tratamento com antibióticos, podem reduzir a absorção de LPS e os índices plasmáticos. No fígado, o LPS é eliminado pelos hepatócitos e excretado na bile. O LPS promove resistência hepática a insulina, hipertrigliceridemia, acúmulo hepático de triglicérides, e secreção de citocinas pró inflamatórias, promovendo a progressão da doença hepática gordurosa. No endotélio, o LPS induz a expressão de moléculas pró-inflamatórias, quimiotáticas e de adesão, que promovem o desenvolvimento da progressão da aterosclerose. No tecido adiposo, o LPS induz adipogênese, resistência à insulina, infiltração de macrófagos, estresse oxidativo e liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

Fonte: Neves AL. Et al. J. Mol Endocrinol. 2013 sep 11:51(2):R51-64

2. Fisiologia Gástrica

A principal função do trato gastrointestinal (TGI) é promover a digestão dos macronutrientes e absorção dos produtos da digestão, além da absorção de água e microelementos. O estômago tem a função de armazenar, homogeneizar, acidificar (com isso protegendo o restante do TGI da infestação por patógenos), liberar seu conteúdo aos poucos e de modo regulado no duodeno. Sua única função vital é a secreção de fator intrínseco que é responsável pela absorção intestinal da vitamina B12. Age na digestão de alimentos, e sua complexidade está no mecanismo de secreção ácida. Suas glândulas secretam no seu lúmen

enzimas, ácidos e mucos, sendo estas as enzimas responsáveis pela quebra dos metabólitos, posteriormente, o ácido por estabilizar o pH ácido que é ideal para as enzimas, e o muco pela proteção das paredes internas do órgão; Quando há alguma falha em um destes mecanismos de secreção estomacal, o organismo sofrerá com efeitos colaterais que implicam na qualidade de vida do paciente (33).

A secreção de muco auxilia na proteção das paredes estomacais contra o pH ácido e na digestão de enzimas, sendo este secretado principalmente pelas glândulas pilóricas. A secreção da pepsina, uma das enzimas estomacais responsáveis pela quebra da maior parte do material proteico ingerido, é estimulada pela liberação de pepsinogênio no estômago, precursor da pepsina, que é estimulado principalmente pelos sinais do sistema autônomo do vaso vago, regulados pela acetilcolina (34).

A secreção ácida é realizada pelas glândulas oxínticas que secretam o ácido clorídrico (HCl), responsável pela acidez do estômago. O estímulo da secreção de HCl ocorre pelo estímulo de complexo gastrina-histamina, sendo a gastrina o principal hormônio que atua nas células parietais estomacais, que quando liberado chega as células semelhantes a enterocromafins (ECL). Por sua vez, quando estimuladas, essas células liberam histamina, que é capaz de estimular a secreção gástrica (35).

Portanto, as doenças gástricas estão relacionadas com falhas em alguns destes mecanismos de secreção, os fatores são múltiplos, porém o excesso de liberação de HCl é considerado o principal e mais frequente fator causador de problemas estomacais (36).

Caracterizada por uma inflamação na parede gástrica, a gastrite é causada pelo contato constante do tecido desprotegido com o PH ácido estomacal, quando esta lesão não se cicatriza com o tempo ocorre a evolução para úlceras, que tem como características lesões mais extensas no tecido gástrico sem afetar a produção do ácido (37).

2.1 Inibidores de Bomba de Prótons

Por ser a célula parietal conhecida por secretar ácido gástrico, muitos medicamentos, com objetivo de inibir a secreção do ácido tem como objetivo atingir a célula parietal. Os IBP's são uma das classes de medicamentos mais vendidos mundialmente, pois combinam um alto nível de eficácia com baixa toxicidade (38).

Os IBP'S são utilizados para reduzir a secreção do ácido gástrico através da inibição irreversível da enzima H^+/K^+ ATPase, parte final da via de secreção ácida.

Os medicamentos desta classe, incluem: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol. Por suprimirem a secreção ácida com eficácia são amplamente utilizados para o tratamento de úlcera péptica, esofagite de refluxo, hipergastrinemia, lesões gastrointestinais causadas por anti-inflamatórios não esteróides, dispepsias, e como componente no tratamento de infecção por *Helicobacter pylori*, Síndrome de Zollinger-Ellison, entre outros (39).

Todos os IBP atualmente utilizados são derivados de benzimidazol, moléculas inorgânicas heterocíclicas, que incluem uma porção de piridina e benzimidazol, então ligadas por um grupo metilsufinil (Figura 2). Os IBP são bases fracas instáveis ao ácido. Estes podem ser encontrados na forma de comprimidos com revestimento entérico, capas de gelatina, ou grânulos revestidos na maneira de pó para solução, podendo também ser encontrado embalado em combinação com bicarbonato conferindo assim, neutralização temporária do pH luminal (40).

Os IBP são absorvidos pelo intestino delgado proximal e atingem as células parietais gástricas, onde se encontram os canalículos secretores de ácidos (Figura 3). Neste momento os IBPs sofrem a clivagem catalisada por ácido de uma ligação sulfóxido quiral (exceto esomeprazol e dexlansoprazol), em ácido sulfênico ativo, se ligando covalentemente aos resíduos de cisteína $H^+ K^+$ ATPase inibindo a secreção do ácido, até que as bombas de substituição possam ser sintetizadas (41).

Em sua forma ativa os IBP são rapidamente metabolizados pelo fígado, e a manutenção dos níveis plasmáticos da droga é altamente afetada pelo metabolismo. O metabolismo dos IBPs por sua vez depende do sistema do citocromo P450, e o polimorfismo CYP2C19 e CYP3A4 são os principais componentes para isto (42).

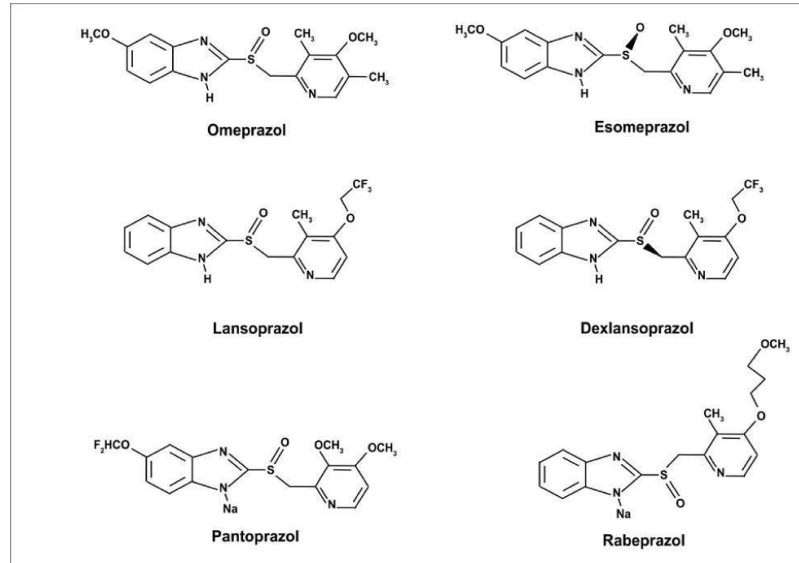


Figura 2. Estruturas moleculares dos IBPs comercializados no Brasil.

Imagem demonstrando a estrutura dos inibidores de bomba de prótons: Omeprazol, Esomeprazol, Lansoprazol, Desxlansoprazol, Pantoprazol e Rabeprazol.

Fonte: (MORSCHER; MAFRA; CARRAO; 2018).

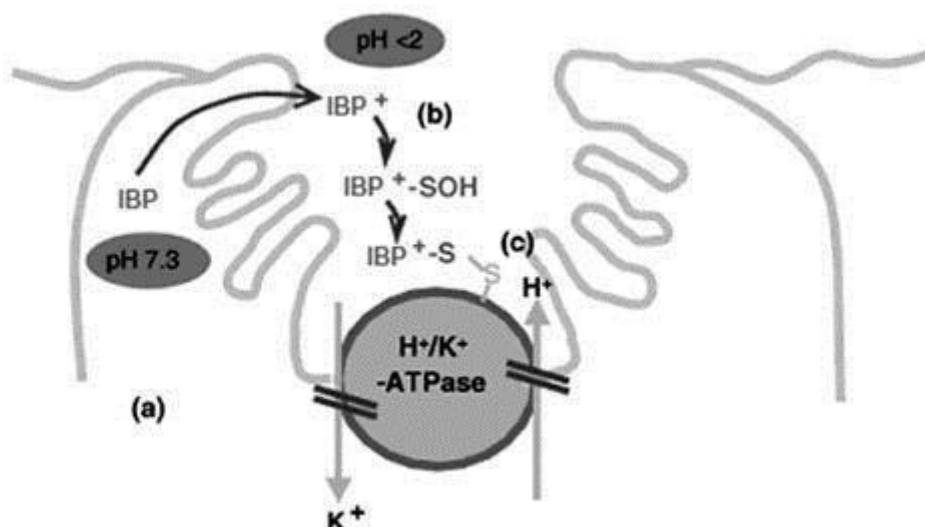


Figura 3: Esquema da ativação da bomba de prótons no canalículo da célula parietal, causando a inibição irreversível da bomba H⁺,K⁺ ATPase pelo IBP ativo. (a) O IBP é transportado da corrente sanguínea para os canalículos da célula parietal (b) Ativação do IBP (c) Estrutura química do IBP passa por transformação, para um derivado sulfonamida e posterior ligação com a bomba H⁺,K⁺ ATPase. Fonte: (PAZ, et al 2018)

2.2 Pantoprazol

O inibidor de bomba de prótons pantoprazol, é considerado padrão ouro no tratamento das doenças pépticas por sua ação na inibição da bomba de prótons (H^+ /K^+ ATPase), que por ligação covalente, a inibe de maneira irreversível, fazendo com que ocorra a supressão do ácido gástrico no lúmen estomacal (43).

Entre os IBPs, um dos mais prescritos na prática clínica é o Pantoprazol (5 – (difluorometoxi) – 2 – [(3,4 – dimetoxi – 2 – piridinil)metil]sufinil- 1H – benzimidazol), que necessita de meio ácido para que haja sua ativação, onde torna-se então uma sulfonamida catiônica, capaz de se ligar ao H^+ /K^+ ATPase, após sua absorção no intestino (44).

Sua ativação ocorre nos canalículos das células secretoras gástricas, portanto ele deve ser administrado de maneira que sua passagem seja intacta no estômago, para isto há diferentes formas de administração deste fármaco. No mercado dispõem-se comprimidos revestidos com proteção gástrica e outras formas farmacêuticas (45).

O tempo da inibição da secreção gástrica pelo pantoprazol, é relacionado ao tempo de produção de uma nova H^+ /K^+ ATPase pelo organismo, o que varia entre organismos, entretanto, a média de sua duração é de 46 horas, sendo superior a outros fármacos da mesma classe, que possuem uma média de duração de 20 horas (46).

2.3 Inibidores de Bomba de Prótons e Microbiota Intestinal

Os IBP's são bem aceitos pelo organismo, sendo raras as reações adversas, por esta razão são prescritos muitas vezes de forma contínua e a longo prazo (47).

Entretanto, o ácido gástrico é um mecanismo de defesa do organismo contra microrganismos, e estudos sugerem que a supressão de forma crônica do ácido gástrico poderia de alguma forma causar efeitos adversos. Estudo de Rodriguez e colaboradores, em 2007 avaliou que os IBP'S são efetivos para o tratamento de distúrbios gástricos, porém a supressão ácida pode alterar a

microbiota do trato gastrointestinal podendo levar a complicações, como: má absorção, infecções entéricas e infecções fora do trato gastrointestinal.

Um estudo no mesmo segmento avaliou pacientes em uso de IBP e concluiu que baixos níveis de ácido gástrico promovem o aumento da flora entérica na porção próxima do intestino, e que ainda, estas bactérias podem ser aspiradas durante episódios de refluxos fisiológicos, podendo causar pneumonia (48).

2.4 Mucinas e Microbiota Intestinal

O papel da barreira intestinal tem sido estudado há décadas, mas os mecanismos exatos envolvidos na proteção da barreira intestinal são diversos e complementares. Dentre eles, a integridade da barreira mucosa é uma das primeiras linhas de proteção do trato gastrointestinal (49).

As mucinas são caracterizadas por sua densa cobertura de glicanos, especialmente da família dos O - glicanos. O trato gastrointestinal, é o meio ideal para a proliferação bacteriana devido ao seu teor equilibrado de sal e água, riqueza em nutrientes e temperatura ideal. O número de bactérias intestinais é próximo ao número de células do nosso corpo, mas ainda assimas bactérias não assumem o controle. Isso se deve em grande parte às mucinas e sua estrutura e função. No entanto, esta não é a única característica notável das mucinas. Certas bactérias comensais são especializadas em degradar os glicanos de mucina e utilizam a energia obtida para alimentar não apenas a si mesmas, mas também seu hospedeiro. O muco e seu principal componente, as mucinas, assim como as mucinas da superfície epitelial, assumiram o papel de proteger as superfícies mucosas internas. Isso requer que as moléculas atuem com propriedades duais, para proteger e remover. A proteção é baseada na construção de um sistema onde o epitélio é protegido do contato. A remoção é baseada em um sistema que requer armadilhas e a possibilidade de mover intrusos para posições menos suscetíveis do hospedeiro, na maioria dos casos, cólon (50).

2.5 Inibidores de Bomba de Prótons e Doença Hepática

A resistência à insulina é um processo fisiopatológico das doenças metabólicas (Pagano, et al, 2002). Na DHGNA ocorre o acúmulo de gordura e inflamação dos hepatócitos decorrente da resistência á insulina que acelera o desenvolvimento da DHGNA (51).

A barreira intestinal é composta por células epiteliais, conhecidos como a barreira natural que previne a translocação de bactérias patogênicas para a circulação sanguínea. Pacientes que apresentam EHNA são caracterizados por apresentar um crescimento bacteriano aumentado no intestino delgado, que pode trazer prejuízos à função intestinal e aumentar a permeabilidade intestinal.

Este crescimento bacteriano também induz a expressão hepática do Toll-Like Receptor 4 (TLR4) e a liberação de interleucina IL-8 (IL8), levando ao estímulo da reação inflamatória. Estudos relacionam ainda, a disbiose intestinal como causadora do aumento de LPS, inflamação e desenvolvimento da DHGNA (52).

Um estudo realizado por Llorente e colaboradores, 2017 (53) mostrou que a supressão de ácido gástrico induziu o supercrescimento de *Enterococcus* intestinal e sua translocação para o fígado (Figura 4).

Balmer, 2014; Henao-Mejia 2012, portanto, indicaram que mudança na homeostase gastrointestinal pode promover doenças hepáticas. Estudos realizado por Dever, 2015, demonstrado uma ligação entre o aumento de *Enterococcus* com indução de inflamação hepática, via receptor de reconhecimento de patógeno – o *Toll Like Receptor* tipo 2 (TLR2), e progressão da doença hepática. Fatores de virulência do *Enterococcus*, tais como gelatinase E27 pode facilitar a translocação bacteriana e contribuir para adoença hepática. *Enterococcus* também tem sido encontrado como causa de peritonite bacteriana espontânea em pacientes com doença hepática em estágio avançado. Em pacientes com cirrose, o risco de infecção bacteriana e suas complicações estão fortemente associadas com medicações de supressão ácida.

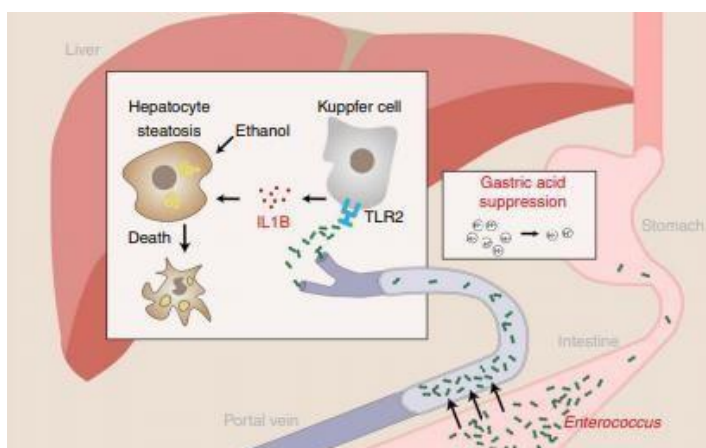


Figura 4: Supressão do ácido gástrico e doença hepática alcoólica

Supressão do ácido gástrico e doença hepática alcoólica. A supressão do ácido gástrico aumenta o *Enterococcus* intestinal, que se transloca para o fígado através da veia porta. *Enterococcus* liga-se ao receptor de reconhecimento de patógeno TLR2 nas células de Kupffer hepáticas, levando à secreção de IL1B. IL1B contribui para a inflamação hepática induzida por etanol e danos aos hepatócitos. Fonte: Llorente, C.; Jepsen, P.; Inamine, T.; Wang, L.; Bluemel, S.; Wang, H.J.; Loomba, R.; Bajaj, J.S.; Schubert, M.L.; Sikaroodi, M.; et al. Gastric acid suppression promotes alcoholic liver disease by inducing overgrowth of intestinal *Enterococcus*. *Nat. Commun.* **2017**, 8, 837

2.6 Lipopolissacarídeo (LPS)

O Lipopolissacarídeo (LPS) é considerado um importante ativador da resposta imunológica, sendo um importante componente estrutural da membrana externa de bactérias Gram-negativas, constituído por glicofosfolípido ancorado a membrana, denominado lipídio A (Figura 5), que confere principal porção relacionada à atividade biológica da molécula, e por um heteropolissacarídeo hidrofílico unidos por ligação covalente (54).

Seus efeitos são mediados principalmente pelo NF- κ B, um fator de transcrição que se mantém inativo no citoplasma e que migra para o núcleo após a interação do LPS com seus receptores, promovendo a transcrição de diversos genes relacionados à resposta inflamatória aguda. Atualmente, o LPS é considerado o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas de infecções por bactérias gram-negativas bem como por inflamação sistêmica (55).

A sinalização do LPS ocorre através de padrões moleculares associados a patógenos, os chamados PAMPs, que são padrões de moléculas reconhecidas pelo sistema imune inato como forma de detectar a invasão por patógenos. No caso das bactérias, fungos e vírus esses receptores são específicos e da classe Toll-Like, os quais são peça chave para a identificação de sensores primários de infecções microbianas e têm fornecido informações significativas na compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e adquirida. Dentre os principais, destaca-se o receptor Toll-Like 4 (TLR4), o qual é facilmente encontrado na superfície de inúmeras células imunes como os monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (56)

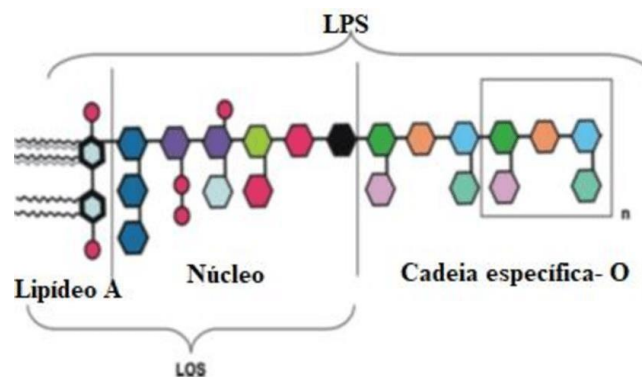


Figura 5: Estrutura LPS.

Estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram negativas

Fonte: <http://smart.servier.com/>

3. HIPÓTESE

A disbiose intestinal desencadeada pelo uso crônico do pantoprazol é capaz de induzir quadro de esteatose hepática em camundongos machos alimentados com dieta normocalórica e normolipídica.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Investigar os efeitos do pantoprazol sobre a modulação da microbiota intestinal e comparar com o possível desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica.

Objetivos específicos:

- Avaliar a microbiota intestinal de animais tratados com pantoprazol por 60 dias, tanto na água de beber quanto por gavagem, através de análise metagenômica;
- Investigar os níveis de LPS circulante, assim como integridade da parede intestinal após o tratamento com pantoprazol;
- Analisar o tecido hepático para verificar o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica e correlacionar com a microbiota intestinal.

5. METODOLOGIA

Caracterização dos Animais

Para realização do estudo foram utilizados 20 animais, camundongos C57BL/6J, machos, adquiridos com quatro semanas de vida, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Optamos por utilizar este modelo animal pois foi o modelo utilizado no artigo utilizado como referência, além de serem isogênicos e possuíram uma genética e fisiologia bem conhecidos. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com até cinco animais em cada gaiola, acondicionados em ambiente apropriado, sob condições estáveis de temperatura (aproximadamente 22°C), com ciclos alternados de claro/escuro com duração de 12 horas cada, com livre acesso a água e alimentação. Ao completarem 12 semanas, os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupo controle (CTL) e pantoprazol (PZOL), e começaram a receber o pantoprazol com o objetivo de haver a supressão do ácido gástrico. O pantoprazol foi oferecido em livre demanda para os animais através do bebedouro, na concentração de 150 mg/kg, o grupo veículo recebeu apenas água. A solução de pantoprazol era trocada em dias alternados, as segundas, quartas e sextas feiras.

Combinado a droga na água utilizando o bebedouro, optamos ainda por realizar o método de gavagem nos animais, como garantia de que todos estariam recebendo o tratamento, isso se deve ao fato da variação na quantidade de água ingerida pelos animais. Então os animais foram gavados em dias alternados, sendo estes, segundas, quartas e sextas feiras, e receberam pantoprazol na concentração de 75 mg/kg. O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento e recebeu água como veículo. Para ajuste do volume a ser administrado os animais eram pesados anteriormente a gavagem, também em dias alternados (Figura 6).

O uso de animais de experimentação neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unicamp (CEUA) sob o protocolo nº 5762-1/2021 e seguiu as orientações da Universidade para o uso de animais em estudos experimentais.

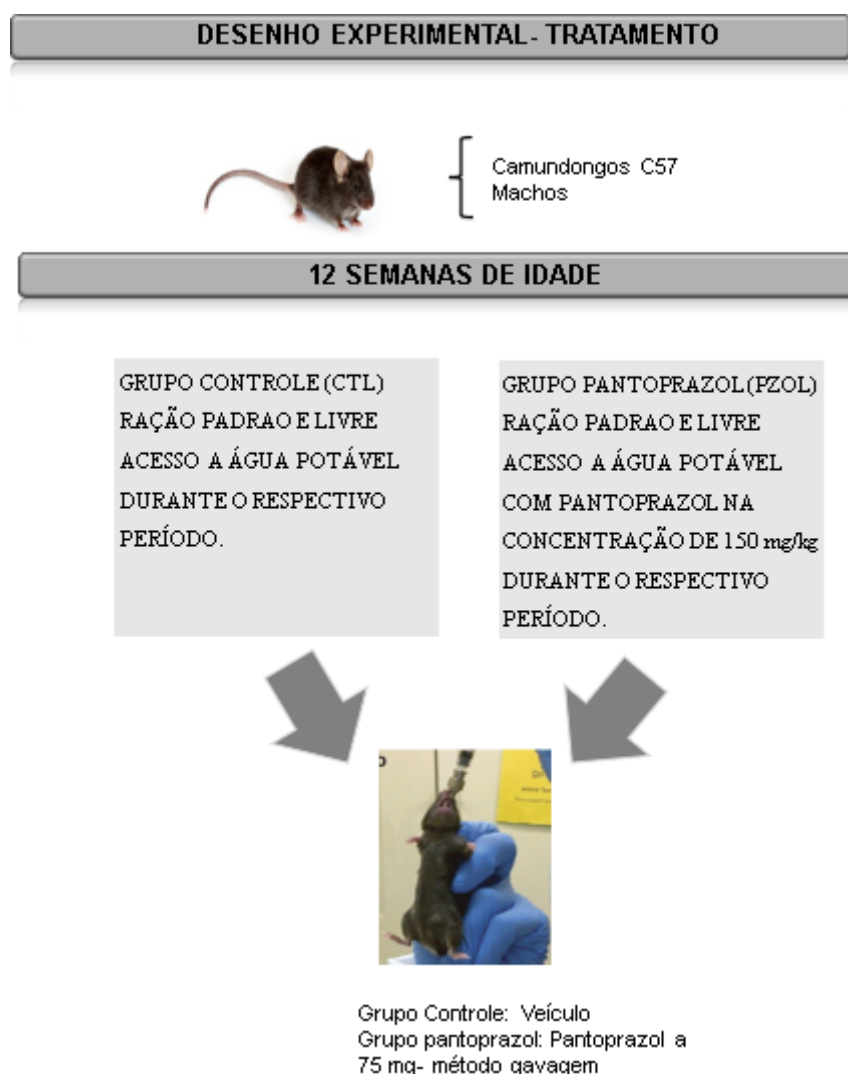


Figura 6: Desenho experimental dos animais.
 Esquema demonstrando o desenho experimental dos animais.
 Fonte: Elaboração própria.

Grupo 1: Grupo controle veículo, composto por 8 animais alimentados com ração padrão e livre acesso a água potável mantidos por 60 dias.

Grupo 2: Grupo tratamento pantoprazol 60 dias (PZOL-60), composto por 11 animais alimentados com ração padrão para roedores (3,39 kcal/g; Nuvilab CR-1, Nuvital Quimtia, Brasil), e livre acesso à água com pantoprazol na concentração de 150 mg/mL. No método de gavagem, os animais foram gavados em dias alternados, as segundas, quartas e sextas e a concentração de pantoprazol estabelecida foi de 75 mg/kg/dia. O método de gavagem combinado a droga na água foi estabelecido como garantia de que todos os animais do grupo pantoprazol estivessem recebendo a mesma concentração da droga.

Protocolo de experimentação

Os animais foram pesados três vezes por semana para ajuste da dose do pantoprazol, de maneira que todos os animais recebessem a mesma dose via gavagem. Após o período, de tratamento foi realizado o teste de tolerância a glicose e teste de tolerância a insulina, e após todos os animais foram eutanasiados e submetidos a extração de tecidos e coleta de material biológico para análise.

Extração de Tecidos e materiais biológicos

Após o período descrito, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina a 10% (100mg/kg) e cloridrato de xilasina a 2% (10mg/kg) por via intraperitoneal e observados até a perda dos reflexos podal e corneano. Uma vez detectada a perda dos reflexos, inicia-se a extração dos tecidos e coleta de materiais biológicos.

Trata-se de procedimento cirúrgico e os tecidos coletados foram: fragmentos de fígado, fragmentos de intestino delgado e fragmentos de intestino grosso. Além destes, também foi coletado o conteúdo fecal das respectivas alças intestinais (delgado e grosso) e também punção venosa da veia cava para obtenção de sangue total e posterior obtenção de soro.

Os tecidos coletados foram processados para uso nas técnicas de histologia, western blotting e PCR. As fezes foram utilizadas para análise metagenômica e o soro usado para mensurar o LPS. Após a extração dos tecidos os animais foram sacrificados utilizando-se uma sobredose de anestésico.

Teste de tolerância glicose (GTT)

A tolerância a glicose foi avaliada através do Teste de Tolerância à Glicose (GTT). Os animais ficaram em jejum de 6 horas, e após esse período a primeira coleta de sangue foi realizada com o animal acordado, no tempo 0 (basal). Em seguida, foi injetada a glicose (1g/kg) via intraperitoneal nos animais, e as amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para dosagem da glicose com auxílio de glicosímetro comercial Accu-Check. A tolerância à glicose foi avaliada pela análise da área sob a curva (AUC).

Teste de tolerância à insulina (ITT)

O teste foi realizado para avaliar a tolerância a insulina uma semana após o teste de tolerância a glicose. Os mesmos animais permaneceram em jejum de 6 horas para avaliar a sensibilidade periférica à insulina no animal

após o tratamento com a droga. Após o respectivo período a primeira coleta de sangue foi realizada com o animal acordado no tempo 0.

Em seguida, foi administrada a insulina regular (1,5 U/kg) nos camundongos e amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para determinação da glicose sérica e mensuradas utilizando glicosímetro comercial Accu-Check. Para essa avaliação a tolerância à insulina foi mensurada pelo *clearance* de glicose sobre os minutos iniciais do desafio de insulina.

Posteriormente, a velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada através da fórmula $Kitt = 0,693/(t_{1/2})$. O $t_{1/2}$ da glicose plasmática, foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima, durante a fase linear de declínio da concentração plasmática.

Dosagem de LPS

Amostras de soro foram obtidas da veia cava e da veia porta e diluídas a 20% (vol./vol.) com água isenta de endotoxinas e, em seguida, aquecidas a 70 °C por 10 minutos para inativar as proteínas séricas. Em seguida, o LPS foi quantificado usando um kit comercial Limulus Amebocyte Assay (Cambrex, Walkersville, MD, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, conforme descrito anteriormente.

Determinação de TG, ALT e AST.

Amostras de fígado foram submetidas à extração de lipídios conforme descrito anteriormente, e as amostras foram homogeneizadas em uma solução contendo clorofórmio e metanol usando o homogeneizador de microtubos BeadBlaster 24 (Benchmark Scientific, Inc., Sayreville, NJ, EUA) e agitadas suavemente durante a noite a 4 °C. Após a incubação, as amostras foram adicionadas com solução de NaCl 0,6% e centrifugadas (4000× g por 20 min a 4 °C) para remoção da camada orgânica. A fração orgânica foi seca em temperatura ambiente, reconstituída em 100 µL de isopropanol e utilizada para quantificação de triglicerídeos (TGs) com um kit enzimático/colorimétrico (LABORLAB, São Paulo, SP, Brasil). A alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) séricas foram medidas no plasma através do método UV cinético usando o Reagente Líquido Estável ALT (GPT) ou AST (GOT) de acordo com as especificações do fabricante (LABORLAB, São Paulo, SP, Brasil).

Histologia

Após dissecação, o tecido extraído foi fixado por imersão de formaldeído 4%, com tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por 24h sendo, então, desidratados, clareados e, por fim, embebidos em parafina.

Fragmentos de fígado foram fixados à temperatura ambiente por imersão em 4% formaldeído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, desidratado, branqueado e embebido em parafina. Cinco cortes micrométricos foram corados com hematoxilina e eosina para analisar a morfologia do fígado ou Picro Sirius red (PS) solução para avaliar a presença ou ausência de fibrose hepática através quantificação do conteúdo de colágeno intersticial. A área de colágeno intersticial foi determinada para toda a seção de fígado corada com PS usando imagens digitalizadas capturado usando o microscópio Axio Scope A1 com Axio Cam MRC digital câmera (Carls Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e o Axio Vision Release 4.8.2 Programas. As imagens coloridas foram convertidas para 8 bits e um P&B padrão foi definido. Como assumimos um sinal de fundo constante (limiar) para todas as imagens, a porcentagem de área positiva para coloração de PS de cada campo foi registrada. Sobre em média, 15 campos foram analisados por animal sob uma objetiva de 20x.

Seções de fígado para coloração de lipídios neutros com ORO foram obtidas e processados com base em estudos anteriores. Resumidamente, fragmentos de fígado foram embutidos em Tissue-Tek O.C.T. composto e imediatamente congelado em n-hexano com nitrogênio líquido (N₂). Quinze seções de criostato em série de micrômetros foram montados em lâminas de vidro revestidas com aminopropiltriétoxissilano. Três seções de diferentes partes das amostras (200 µm de distância) foram descartados por lâmina, e foram analisadas duas lâminas por animal. As seções do fígado foram incubadas com ORO durante 10 min à temperatura ambiente e depois enxaguado com água da torneira durante 30 min. Depois, um meio de montagem solúvel em água foi usado antes da observação por microscopia. Quatro campos diferentes de cada seção foram adquiridos com um Olympus Microscópio BX51TF equipado com câmera digital (DP72, Olympus, Tokyo, Japão) sob um objetivo de 20x. As imagens coloridas foram convertidas para 8 bits.

Depois disso, um vermelho padrão foi definido e o limite foi ajustado para avaliar a densidade óptica da área positiva para coloração ORO de cada

campo. Um sinal de fundo individual foi assumido para cada imagem. Todas as análises foram realizadas usando o software ImageJ (versão 1.53e)

O íleo foi coletado dos animais e este segmento intestinal foi limpo e aberto longitudinalmente com a face luminal voltada para cima. Delicadamente e lentamente o íleo foi enrolado ao redor do palito. Uma vez que todo o comprimento do íleo foi enrolado, este foi colocado em um cassete de tecido e fixado a temperatura ambiente por imersão em formaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M Ph 7,4 desidratado, branqueado e embebido em parafina. Em cada cassete temos íleo swis roll de três camundongos diferentes. Cinco sessões micrométricas foram coradas com azul alcian pH 2,5 (AB) para corar o muco. As imagens digitalizadas foram capturadas usando o microscópio Axio Scope A1 com câmera digital Axio Cam MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e o software Axio Vision Release 4.8.2. As imagens coloridas foram convertidas para 8 bits e um P&B padrão foi definido. A porcentagem da área positiva para coloração de muco foi medida.

Determinação e Análise da Expressão de Proteínas

Expressão e fosforilação das principais proteínas envolvidas na homeostasia da parede intestinal (*"tight junctions"*) e proteínas envolvidas na ativação de vias inflamatórias no fígado e intestino, através das técnicas descritas abaixo.

Os camundongos foram mantidos em jejum por 6 horas antes dos procedimentos. Os ratos foram anestesiados com administração intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg) e xilazina cloridrato (10 mg/kg), e após a perda dos reflexos do pé, da cauda e da córnea, eles foram utilizados. Fragmentos de fígado e intestino (~ 100mg) foram coletados e homogeneizado em tampão de extração (10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris (pH 7,4), contendo 100 mmol/L de pirofosfato de sódio, 100 mmol/L de fluoreto de sódio, 10 mmol/L vanadato de sódio, 2 mmol/L PMSF e 0,1 mg de aprotinina/mL, 1% Triton-X 100). As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm e 4°C e o sobrenadante foi usado. As amostras foram submetidas a eletroforeses. Os anticorpos primários utilizados foram anti-fosfo-JNK (sc-6254 Santa Cruz), anti-JNK (sc-1648 Santa Cruz), anti-TGFβ (ab92486 Abcam), anti-Receptor de TGFβ (ab31013 Abcam), anti-TLR4 (ab22048 Abcam), anti-Myd88 (sc-11356 Santa Cruz), anti-ZO-1 (61-7300 Thermo Fisher), anti-Ocludina (71-1500 Thermo Fisher), anti-Claudin 1 (#13995 Cell Signalling), anti-E-caderina (sc-7870 Santa Cruz), anti-Beta catenina (sc-1496 Santa Cruz), anti-α-tubulina (#2144 Sinalização Celular) e

anti- β -actina (#4967 Sinalização Celular) a 1:1.000 diluição. O anticorpo secundário (Thermo Scientific) ligado a uma peroxidase molécula, na diluição de 1:10.000, reagiu com a solução de quimioluminescência (kit de substrato Clarity™ Western ECL, BioRad ©) e as membranas foram desenvolvidas em fotodocumentação (Gel Doc™ XR, BioRad ©), gerando arquivos digitais. Posteriormente, as imagens foram analisadas usando o software ImageLab (v. 5.2.1 build 11, BioRad © Laboratories).

Análise da microbiota por sequenciamento RNAr 16S

As amostras de fezes dos animais foram coletadas de ambos os grupos (controle e tratado), antes e após o tratamento com pantoprazol.

Amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal após (n=8) o período de tratamento e foram armazenados a -80 °C até a análise. As amostras foram coletadas, armazenadas e processadas em um ambiente controlado para minimizar o risco de contaminação. O DNA genômico de 200mg de fezes foi extraído usando o kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha). Um controle negativo (água do QIAamp DNA Stool Mini Kit) de uma extração passo para o sequenciamento final e o padrão da comunidade de DNA microbiano simulado foi usado como controle positivo (ZymoBIOMICS Irvine, CA, EUA). Para cada amostra a região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada seguido pelo guia de preparação da biblioteca de sequenciamento metagenômico Illumina 16S. A composição taxonômica das comunidades bacterianas foi obtida analisando a região V3–V4 do gene 16S rRNA usando a plataforma Illumina® MiSeq.

As construções das bibliotecas de sequenciamento de DNA foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, EUA) e seguiu o mesmo fluxo descrito por Caporaso et al. (2012). O fastq sequências foram analisadas usando o software Illumina 16S Metagenomics que realiza a classificação taxonômica da região V3-V4 do rRNA 16S gene usando o banco de dados DADA2; Análises de abundância pareadas foram realizadas usando o software IBM SPSS® 20.0 (Teste de Ranks Sinalizados Wilcoxon).

q.PCR

O RNA total foi obtido do íleo, cólon e fígado de ambos os grupos de camundongos usando o RNeasy Mini Kit da Qiagen conforme descrito no protocolo do fabricante (Qiagen Inc, CA, EUA). Para amostras de tecido, o cDNA da primeira fita foi sintetizado usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade, conforme descrito no protocolo do fabricante (Applied Biosystem, CA, EUA). TaqMan e Quant Studio 6 Flex Real-Time PCR System e software Data Assist™ Applied Biosystems, CA, EUA) foram usados para obter os níveis de expressão relativa dos genes: Ocln Mm00500912_m1; Tjp2 Mm00495620_m1; Cldn1 Mm00516701_m1; Tjp1 Mm00493699_m1; Aqp3 Mm01208560_m1; Glpr2 Mm01329475_m1. SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystem, CA, EUA) foi usado para obter os níveis de expressão relativa dos genes: 150 nM de Tlr4 (Fw: 5'- GGCCATTGCTGCCAACAT -3'; Rv: 5'- CAACAATCACCTTTTCGGCTTTT -3'), 150 nM de primers direto e reverso MyD88 (Fw: 5'- TCGATGCCTTCATCTGCTATTG -3'; Rv: 5'- GGT CGGATCATCTCCTGCACAAA -3') e 150 nM de Irf3 (Fw: 5'- TTCCCGGGAGGGATAAGC -3'; Rv: 5' - GGGCAGAGCGGAAATTCC -3) [53]. A expressão de Gapdh e B2m foi usada como controle endógeno, e amostras de camundongos controle foram usadas como calibradores. Um “No Template Control” negativo também foi incluído para cada par de primers. Para o preparo das bibliotecas foram necessários 12,5 ng de DNA por amostras, 5 mM de *primers* (ou iniciadores) específicos para a amplificação da região altamente conservada (V3 e V4) do gene 16S bacteriano e 12,5 uL do pré-mix 2x KAPA HIFI hotStart (Manufacturing, R&D Cape Town, South Africa)

Análise Estatística

Os dados que obedeceram uma distribuição paramétrica foram avaliados através do teste T de Studente. Os dados que não obedeceram uma distribuição paramétrica foram avaliados com o teste de Kruskal Wallis. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Para as análises de histologia os dados foram analisados através do teste de Shapiro-Wilk e teste de Levene para avaliar o padrão de distribuição e a variância das variáveis. Para isto, as variáveis foram adequadamente apresentadas em média $\pm$ desvio.

Para a análise dos dados e gráficos utilizamos o programa *GraphPad Prism version 5.00 for Windows*¹.

A análise da diversidade alfa e beta foi realizada usando o Analista de Microbioma. Os gráficos foram gerados pelo GraphPad Prism 7.0

6. RESULTADOS- ARTIGO PUBLICADO

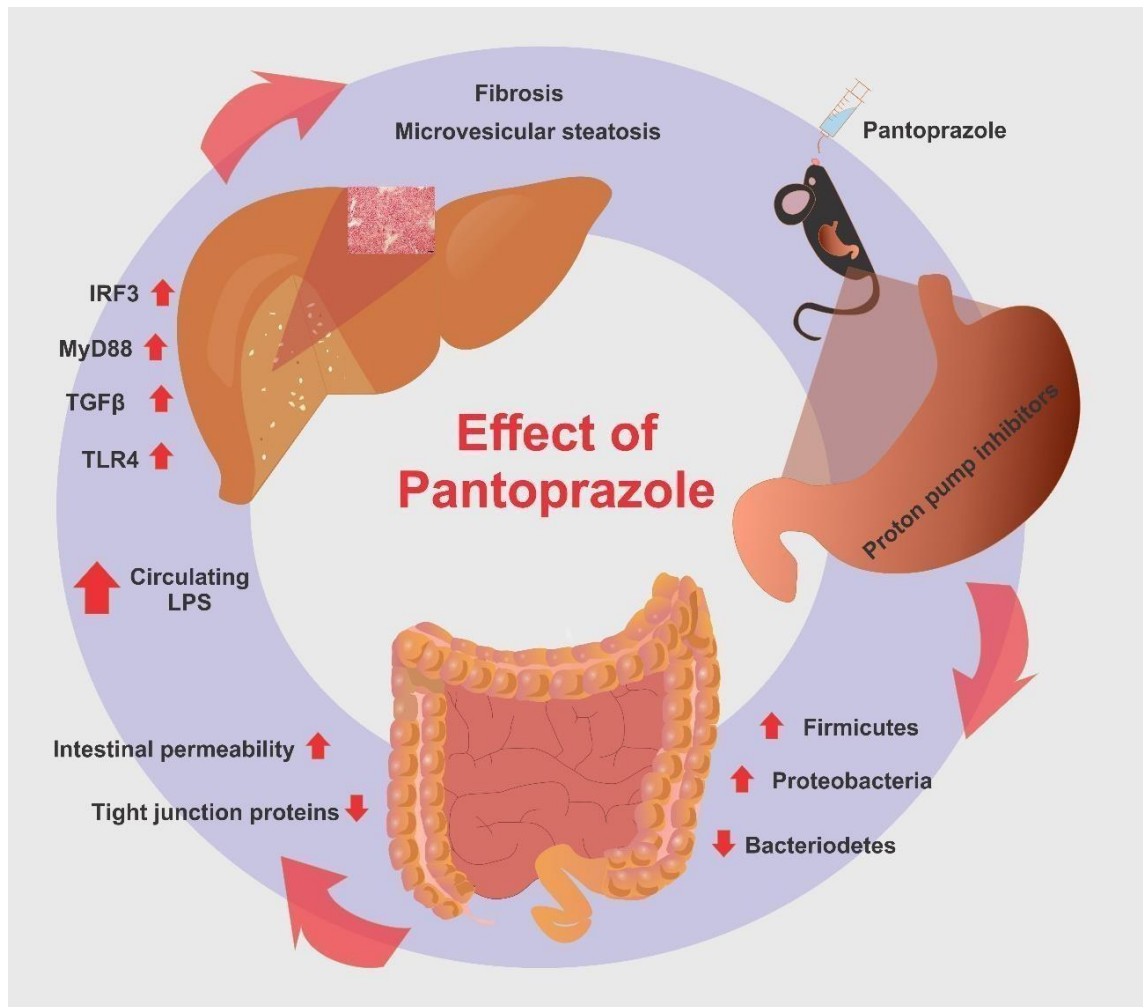


Figura 7: Graphical Abstract.
Fonte: Elaboração própria.



Article

Proton Pump Inhibitor Pantoprazole Modulates Intestinal Microbiota and Induces TLR4 Signaling and Fibrosis in Mouse Liver

Heloisa B. Assalin ^{1,†}, Kelly Cristiane Gabriel De Almeida ^{1,†}, Dioze Guadagnini ^{1,*}, Andrey Santos ¹, Caio J. Teixeira ², Silvana Bordin ², Guilherme Z. Rocha ¹ and Mario J. A. Saad ^{1,*}

¹ Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas 13080-655, SP, Brazil

² Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05508-000, SP, Brazil

* Correspondence: dioze@unicamp.br (D.G.); msaad@unicamp.br (M.J.A.S.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Proton pump inhibitors (PPIs) are one of the most prescribed drugs around the world. PPIs induce microbiota modulation such as obesity both in humans and in animal models. However, since PPIs can induce microbiota modulation despite the absence of a high-fat diet or weight gain, it is an interesting model to correlate microbiota modulation with the establishment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). We investigated the effect of pantoprazole treatment on TLR4 signaling and liver histology in C57BL/6J mice for 60 days, trying to correlate microbiota modulation with some aspects of liver injury. We performed glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests, serum lipopolysaccharide (LPS) dosage, liver histology, liver and intestine extraction for Western blot and qPCR. Fecal microbiota were investigated via metagenomics. Chronic treatment with pantoprazole induced microbiota modulation and impaired ileum barrier integrity, without an association with insulin resistance. Furthermore, increased circulating LPS and increased Toll-like receptor 4 (TLR4) and TGF β downstream signaling may have an important role in the development of the observed liver microvesicular steatosis and fibrosis. Finally, this model of PPI-induced changes in microbiota might be useful to investigate liver microvesicular steatosis and fibrosis.

Keywords: microbiota; proton pump inhibitors; liver steatosis



Citation: Assalin, H.B.; De Almeida, K.C.G.; Guadagnini, D.; Santos, A.;

Teixeira, C.J.; Bordin, S.; Rocha, G.Z.; Saad, M.J.A. Proton Pump Inhibitor Pantoprazole Modulates Intestinal Microbiota and Induces TLR4 Signaling and Fibrosis in Mouse Liver. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13766. <https://doi.org/10.3390/ijms232213766>

Academic Editor: Walter Wahli

Received: 31 August 2022

Accepted: 2 November 2022

Published: 9 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

PPIs are one of the most prescribed drugs around the world [1–4] to treat heartburn, gastroesophageal reflux disorder (GERD) and to prevent gastroduodenal ulcers [2–4]. Most of the time, these drugs are prescribed for long periods without weighing up the risks and benefits. The list of adverse events induced by these drugs has increased in the past few years, but it is important to mention that only a few have established causalities [5–9].

PPIs have clear effects on structural and functional changes in the gastric mucosa, but the relationship between these drugs and gastrointestinal malignancies is not evidence-based [10–13]. On the other hand, previous data showed that chronic PPI use could be accompanied by an increased risk of enteric infections [9]. These data are supported by epidemiologic studies and meta-analyses, and the mechanism seems to be related to changes induced by these drugs on the gut microbiota [14–22]. The microbiota modulation induced by PPIs is very similar to microbiota seen in animal models of obesity and human obesity [23–27]. In this regard, changes in microbiota composition have been causally related to obesity and its complications [23–26].

NAFLD is one of the most common complications of obesity, and its prevalence (from 1989 to 2017) in the world population has ranged from 11.2% to 37.2% [28–30]. In the past five years, data coming from different sources have shown that dysbiosis has an important role in the development of NAFLD [28–30]. The mechanisms by which microbiota modulation can have a role in the induction of NAFLD include the reduced production of short-chain fatty acids produced by bacteria and increased serum LPS, indicating an alteration in the intestinal barrier, which will induce liver inflammation through TLR4 [23]. NAFLD can progress to NASH, which is characterized by advanced fibrosis, and this process seems to be influenced by the microbiota [28–32]. Recent evidence suggests a link between NAFLD and PPI use, probably through gastric achlorhydria which induces alterations in microbiota, but these studies were performed in alcohol-fed mice and in obese mice [33,34].

It is important to mention that most animal models of NAFLD and NASH use

a high-fat diet or high-caloric diet, which by themselves can modulate microbiota, making it difficult to establish a direct correlation between gut microbiota with NAFLD. However, since PPIs can induce microbiota modulation similar to obesity, but without a high-fat diet or weight gain, we believe that it is an interesting model to correlate microbiota modulation with liver injury. Thus, we investigated the effect of pantoprazole treatment for 60 days on glucose metabolism, the intestinal barrier integrity, associated with TLR4 signaling, and liver histology, trying to correlate microbiota modulation with some aspects of liver injury.

2. Results

2.1 Animal Characterization

Pantoprazole-treated (PZOL) mice presented similar body weights at the end of treatment when compared to vehicle-treated mice (CTL) (CTL: 26.84 ± 2.289 and PZOL: 25.86 ± 1.136 ; p-value 0.2196; Figure 1A). Furthermore, the GTT also presented similar curves (Figure 1B) without any difference in the area under the curve (CTL: $18,174 \pm 2171$ and PZOL: $16,202 \pm 2411$; p = 0.1075). On the other hand, the fasting blood glucose was lower in PZOL mice than in CTL mice (CTL: 103.3 ± 7.44 and PZOL: 80.88 ± 12.93 ; p-value 0.0008; Figure 1C), and it also showed a tendency to be lower at the end of the GTT, i.e., 120 min after glucose infusion (CTL: 153 ± 24.8 and PZOL: 132 ± 33.0 ; p-value 0.1368; Figure 1D). In addition, pantoprazole treatment was able to improve insulin sensitivity, as shown by the increase in kITT (CTL: 5.057 ± 2.820 and PZOL: 8.171 ± 1.674 ; p-value 0.0077; Figure 1E).

2.2 Microbiome Data Analysis after 60 Days of Pantoprazole

To investigate how pantoprazole treatment, for 60 days, affected microbiota, first, we analyzed the α -diversity, estimated by the Shannon index. This method is used to measure the diversity present within a sample or community. The Shannon index considered two measures: richness (total number of species) and evenness (abundances of the species). The alpha diversity was higher in the PZOL group when compared with the CTL group (p-value 0.0009; Figure 2A).

Then, we analyzed the beta diversity, which provides a way to compare the diversity or composition between two samples or microbial communities. This analysis was performed using the phyloseq package [35]. Principal coordinate analysis (PCoA) based on the Bray–Curtis distance parameter showed the essential difference between the PZOL group and the CTL group. A p -value for each comparison was obtained from PERMANOVA and considered significant at p -value < 0.05 . (PERMANOVA F-value: 31.518; R-squared: 0.69243; p -value < 0.001 ; Figure 2B). In hierarchical cluster analysis, each sample begins as a separate cluster and the algorithm proceeds to combine them until all samples belong to one cluster. The hierarchical cluster analysis at the genus level was based on Bray–Curtis metrics and Ward’s linkage (clustering to minimize the sum of squares of any two clusters). The sample hierarchical cluster analysis (dendrogram and heatmap) showed that the PZOL group and CTL group belonged to two clusters (Figure 2C,D).

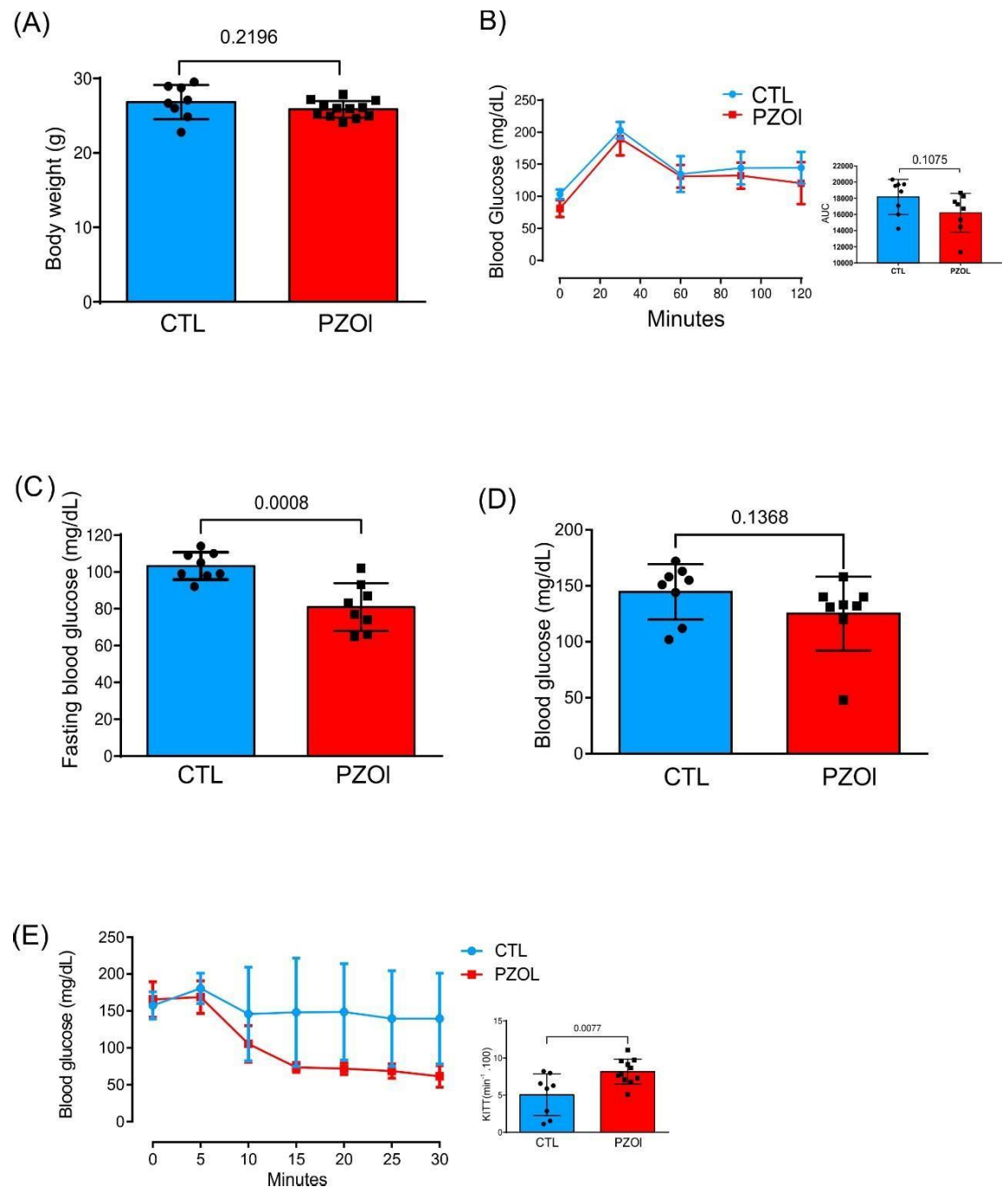


Figure 1. Effect of pantoprazole treatment. (A) Body weight (CTL: $n = 8$ and PZOI: $n = 12$); (B) GTT curve and AUC (CTL: $n = 8$ and PZOI: $n = 8$); (C) fasting blood glucose (CTL: $n = 8$ and PZOI: $n = 8$); (D) blood glucose 120 min after glucose injection (CTL: $n = 8$ and PZOI: $n = 8$); (E) kITT, from CTL and PZOI-treated mice (CTL: $n = 8$ and PZOI: $n = 11$). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation and t -test statistical comparisons.

The taxonomic composition at the phylum and genus level can be viewed at the individual-sample level (Figure 3A,B). LDA Effect Size (LEfSe) was used for the biomarker discovery and explanation of high-dimensional metagenomic data. It incorporated statistical significance with biological consistency (effect size) estimation. It performed a non-parametric factorial Kruskal–Wallis (KW) sum-rank test, and the default was an adjusted p -value cutoff = 0.05. The LEfSe

analysis confirmed the differences between the PZOL and CTL group and identified a total of three phyla enriched in the PZOL group (Firmicutes, Tenericutes and Proteobacteria) and just one phylum in the CTL group (Bacteroidetes)

(Figure 3C). At the genus level, there were five genera enriched in the CTL group (*Clostridium*, *Sutterella*, *Candidatus_Arthromitus*, *Bacteroides* and *Parabacteroides*) and six genera in the PZOL group (*Bifidobacterium*, *Bilophila*, *Anaeroplasmata*, *Oscillospira*, *Helicobacter* and *Odoribacter*). (Figure 3D). BioProject accession number PRJNA751763 (www.ncbi.nlm.nih.gov (accessed on 3 August 2021)).

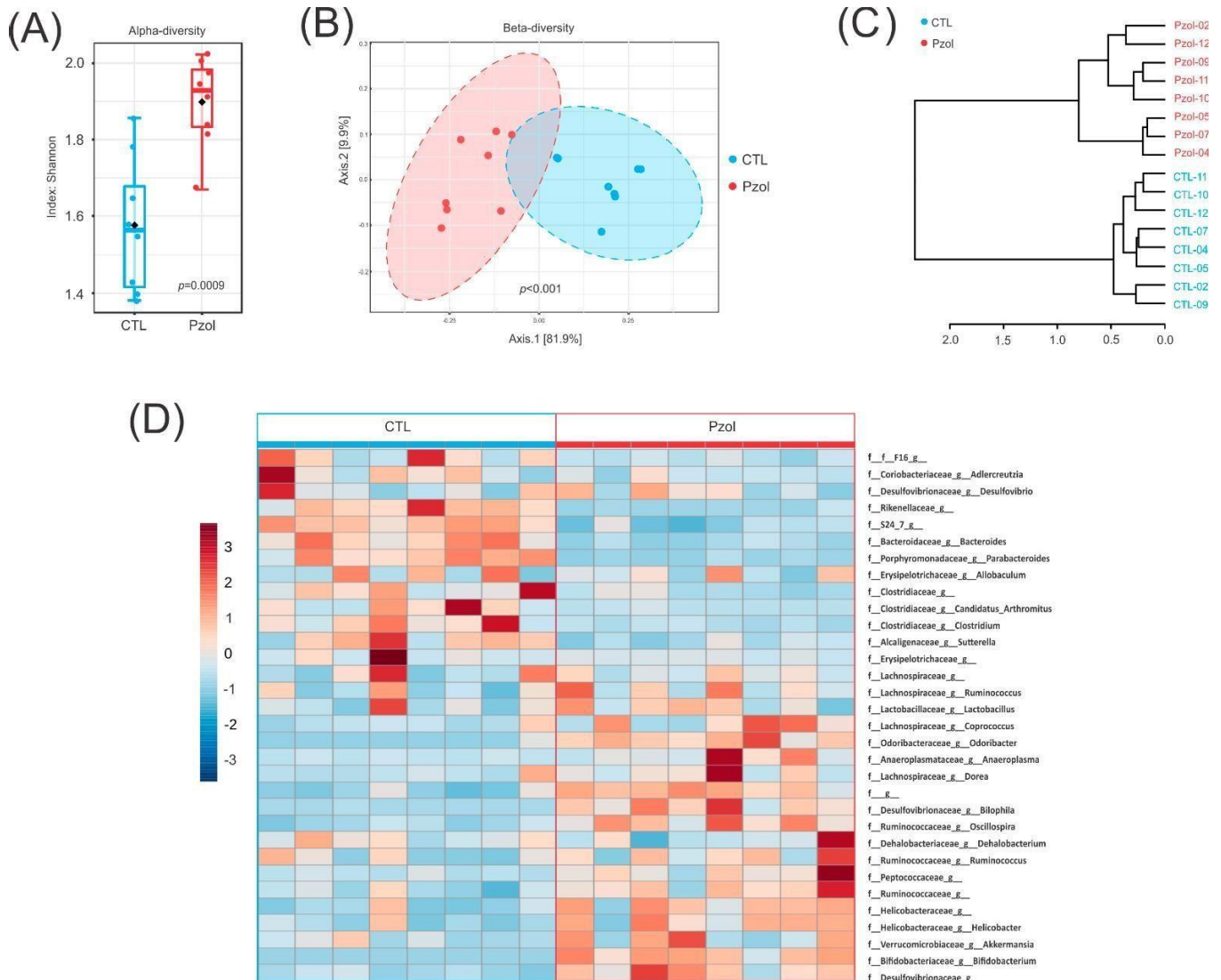


Figure 2. Community profiling and clustering analysis. **(A)** Alpha diversity measure using Shannon diversity index at genus level represented as boxplot. Each boxplot represents the diversity distribution of a group (p -value: 0.0009—Mann-Whitney); **(B)** beta diversity. Principal coordinate analysis (PCoA): comparison of between-community diversity based on Bray–Curtis distance parameter. p -value for each comparison was obtained from PERMANOVA and considered significant at p -value < 0.05 . [PERMANOVA] F-value: 31.518; R-squared: 0.69243; p -value < 0.001 ; **(C,D)** hierarchical cluster analysis: each sample begins as a separate cluster and the algorithm proceeds to combine them until all samples belong to one cluster; **(C)** dendrogram; and **(D)** heatmap. ($n = 8$ animals per group).

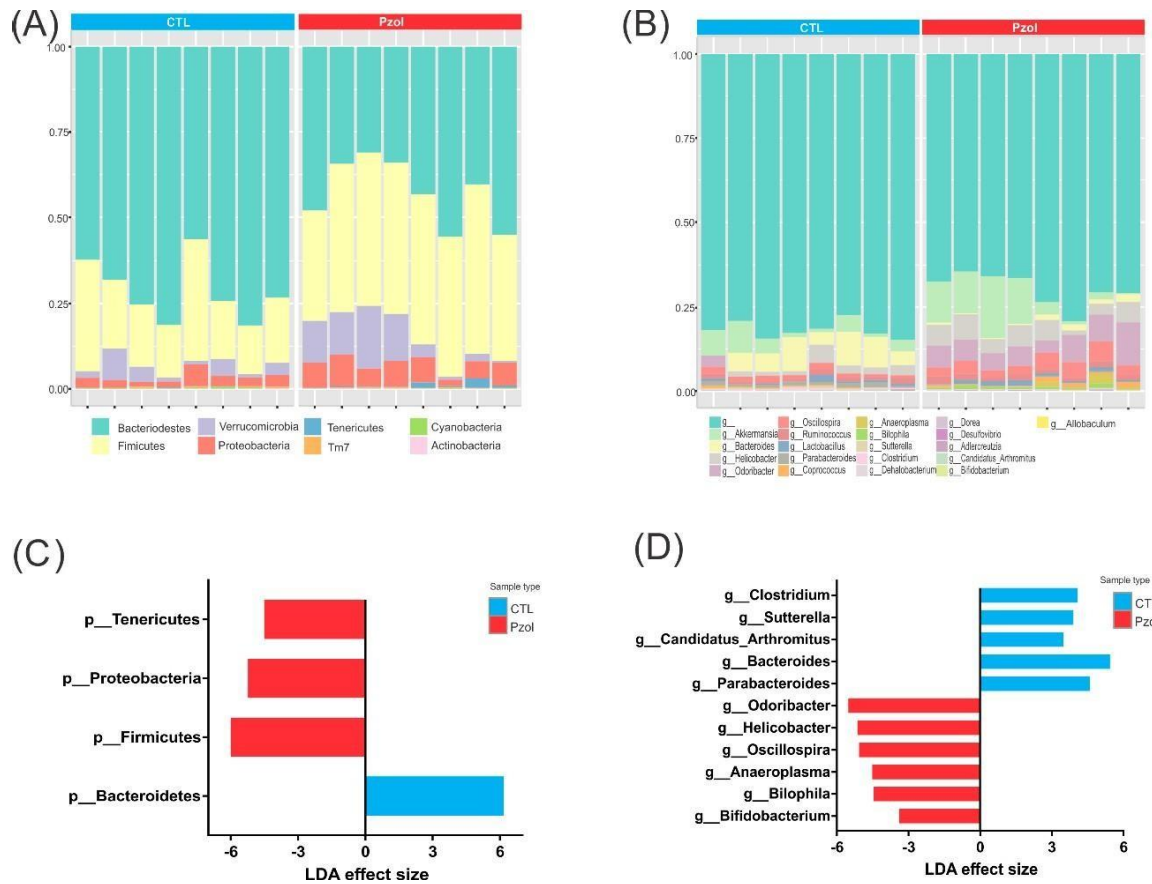


Figure 3. Taxonomic composition of community and LEfSe at phyla or genus level. Taxonomic composition of community through direct quantitative comparison of abundances of phyla (A) and genus (B) using stacked bar plot at individual sample level. LDA Effect Size (LEfSe) for phyla (C) and genus (D). LDA was used for biomarker discovery and explanation of high-dimensional metagenomic data. It incorporates statistical significance with biological consistency (effect size) estimation. The default was adjusted p -value cutoff = 0.05. (n = 8 animals per group).

2.3 Pantoprazole-Induced Alterations in mRNA and Proteins of the Epithelial Barrier Integrity in Ileum but Not in Colon

Previous data showed that the modulation of microbiota can induce alterations in epithelial barrier integrity, which in most cases is accompanied by an increase in circulating LPS. Since LPS from microbiota reach the liver through the portal vein before reaching peripheral circulation, we determined LPS levels in the portal veins and peripheral veins of the CTL and PZOL groups. The results showed that LPS was higher in the PZOL group in both the portal (CTL: 0.5875 ± 0.0665 and PZOL: 0.725 ± 0.1128 ; p -value 0.05) and cava (CTL: 0.5575 ± 0.1444 and PZOL: 0.7331 ± 0.1161 ; p -value 0.0034) veins, suggesting that this bacterial lipid translocates the intestinal epithelial barrier (Figure 4A,B).

We next investigated the effect of pantoprazole on the proteins of the intestinal epithelium barrier in the ileum and colon. The results showed that 60 days of treatment with pantoprazole induced a reduction in tight junction proteins claudin (CTL: 0.9375 ± 0.3377 and PZOL: 0.4712 ± 0.1813 p-value 0.0040), occludin (CTL: 0.4325 ± 0.4444 and PZOL: 0.1 ± 0.0886 ; p-value 0.1927) and ZO-1 (CTL: 1 ± 0.2084 and PZOL: 0.001 ± 0.0008 ; $p < 0.0001$) in the ileum (Figure 4C,D). Moreover, the adherens junctions E-cadherin (CTL: 1 ± 0.5660 and PZOL: 0.0582 ± 0.1145 ; p-value 0.0286) and beta-catenin (CTL: 1.01 ± 0.2940 and PZOL: 0.4325 ± 0.0386 ; p-value 0.0080) were also decreased in ileum (Figure 4C,D). Analyzing these proteins in the colon, we observed similar levels between the groups claudin (CTL: 1.3225 ± 0.2315 and PZOL: 1.0675 ± 0.2519 p-value 0.1867), occludin (CTL: 1.02 ± 0.2284 and PZOL: 0.87 ± 0.0920 ; p-value 0.2689) and ZO-1 (CTL: 1.0125 ± 0.3531 and PZOL: 1.125 ± 0.4313 ; p-value 0.7005), E-cadherin (CTL: 0.975 ± 0.4260 and PZOL: 0.9875 ± 0.4761 ; p-value 0.9701) and beta-catenin (CTL: 0.9925 ± 0.1635 and PZOL: 0.9775 ± 0.3995 ; p-value 0.9469) (Figure 5A,B). and PZOL: 0.4712 ± 0.1813 p-value 0.0040), occludin (CTL: 0.4325 ± 0.4444 and PZOL: 0.1 ± 0.0886 ; p-value 0.1927) and ZO-1 (CTL: 1 ± 0.2084 and PZOL: 0.001 ± 0.0008 ; $p < 0.0001$) in the ileum (Figure 4C,D). Moreover, the adherens junctions E-cadherin (CTL: 1 ± 0.5660 and PZOL: 0.0582 ± 0.1145 ; p-value 0.0286) and beta-catenin (CTL: 1.01 ± 0.2940 and PZOL: 0.4325 ± 0.0386 ; p-value 0.0080) were also decreased in ileum (Figure 4C,D). Analyzing these proteins in the colon, we observed similar levels between the groups claudin (CTL: 1.3225 ± 0.2315 and PZOL: 1.0675 ± 0.2519 p-value 0.1867), occludin (CTL: 1.02 ± 0.2284 and PZOL: 0.87 ± 0.0920 ; p-value 0.2689) and ZO-1 (CTL: 1.0125 ± 0.3531 and PZOL: 1.125 ± 0.4313 ; p-value 0.7005), E-cadherin (CTL: 0.975 ± 0.4260 and PZOL: 0.9875 ± 0.4761 ; pvalue 0.9701) and beta-catenin (CTL: 0.9925 ± 0.1635 and PZOL: 0.9775 ± 0.3995 ; p-value 0.9469) (Figure 5A,B).

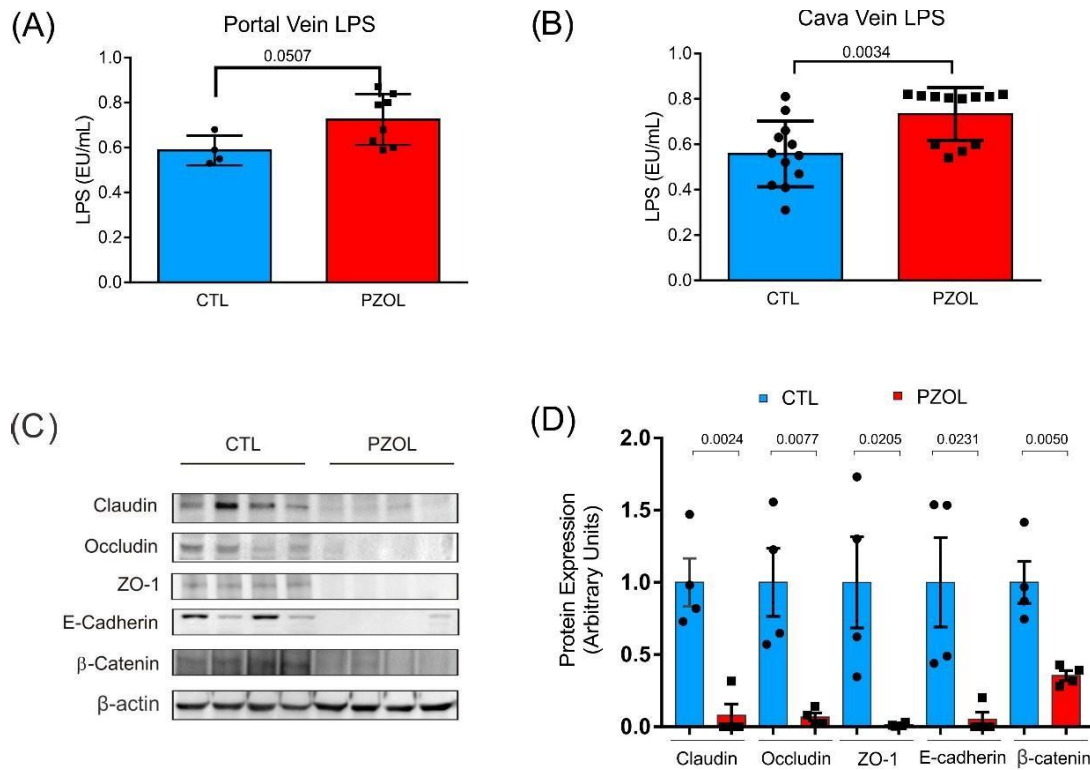


Figure 4. Pantoprazole induced alterations in epithelial barrier integrity in ileum. **(A)** LPS levels in portal vein (CTL: $n = 4$ and PZOL: $n = 8$) and **(B)** cava vein (CTL: $n = 12$ and PZOL: $n = 12$); **(C)** tissue levels of tight junction proteins (claudin, occludin and ZO-1), and adherens junction proteins (e-cadherin and beta-catenin) and **(D)** quantification of the Western blots (CTL: $n = 4$ and PZOL: $n = 4$). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation and t -test statistical comparisons.

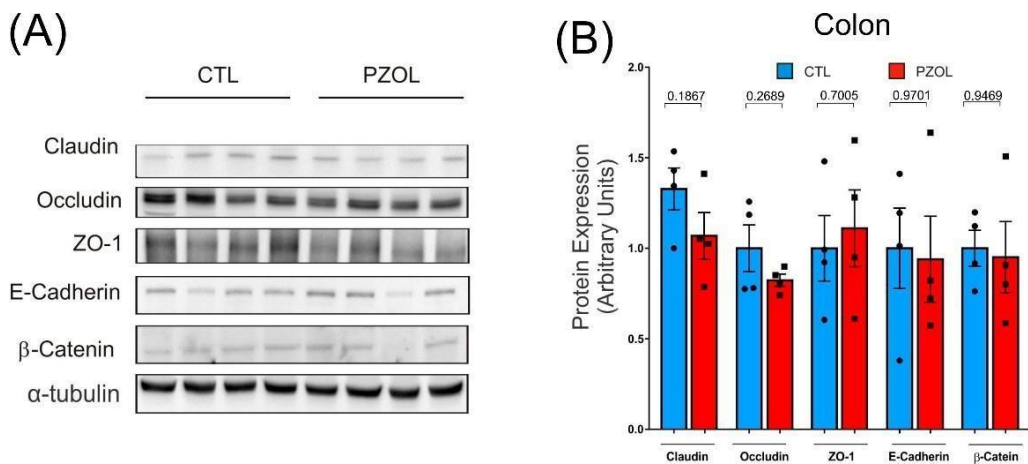


Figure 5. Pantoprazole does not induce alterations in epithelial barrier integrity in colon. **(A)** Tissue levels of tight junction proteins (claudin, occludin and ZO-1), and tissue levels of adherens junction proteins (e-cadherin and beta-catenin); **(B)** quantification of the Western blots ($n = 4$ to 8 animals per group). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation and t -test statistical comparisons.

The reduction in protein levels may be a consequence of reduced protein synthesis and/or increased protein degradation. We then investigated the expression of mRNA of the proteins of the intestinal epithelial barrier in the ileum. The results showed that there was a decrease in OCLN mRNA (CTL: 0.05216 ± 0.002065 and PZOL: 0.0150 ± 0.0070 ; p-value 0.0043; Figure 6A) and TJP2 mRNA (CTL: 0.0146 ± 0.0020 and PZOL: 0.0091 ± 0.0023 ; p-value 0.0260; Figure 6B), but no change in CLDN1 mRNA (CTL: 0.0001524 ± 0.0001118 and PZOL: 0.0002318 ± 0.0001475 ; p-value 0.4762; Figure 6C) and an increase in TJP1. The reduction in protein levels may be a consequence of reduced protein synthesis and/or increased protein degradation. We then investigated the expression of mRNA of the Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 13766 7 of 18 proteins of the intestinal epithelial barrier in the ileum. The results showed that there was a decrease in OCLN mRNA (CTL: 0.05216 ± 0.002065 and PZOL: 0.0150 ± 0.0070 ; p-value 0.0043; Figure 6A) and TJP2 mRNA (CTL: 0.0146 ± 0.0020 and PZOL: 0.0091 ± 0.0023 ; p-value 0.0260; Figure 6B), but no change in CLDN1 mRNA (CTL: 0.0001524 ± 0.0001118 and PZOL: 0.0002318 ± 0.0001475 ; p-value 0.4762; Figure 6C) and an increase in TJP1 mRNA (CTL: 0.02272 ± 0.0096 and PZOL: 0.0512 ± 0.01425 ; p-value 0.0152; Figure 6D). In addition, there was a decrease in Aqp3 mRNA expression (CTL: 0.0052 ± 0.0024 and PZOL: 0.0011 ± 0.0011 ; p-value 0.0043; Figure 6E) and GLP2R mRNA (CTL: 0.0004 ± 0.0001 and PZOL: $0.0001 \pm 3.953 \times 10^{-5}$; p-value 0.0173; Figure 6F).

Alcian blue (AB) staining was used to visualize the total (neutral and acid) mucins in the ileum. A lower protein level of mucin was found in the ileum in the PZOL group compared to the CTL group, with the differences being statistically significant (CTL: $15,835 \pm 2984$ and PZOL: 8609 ± 2327 ; p-value 0.0027) (Figure 7). Our data suggest that animals treated with pantoprazole for 60 days had altered

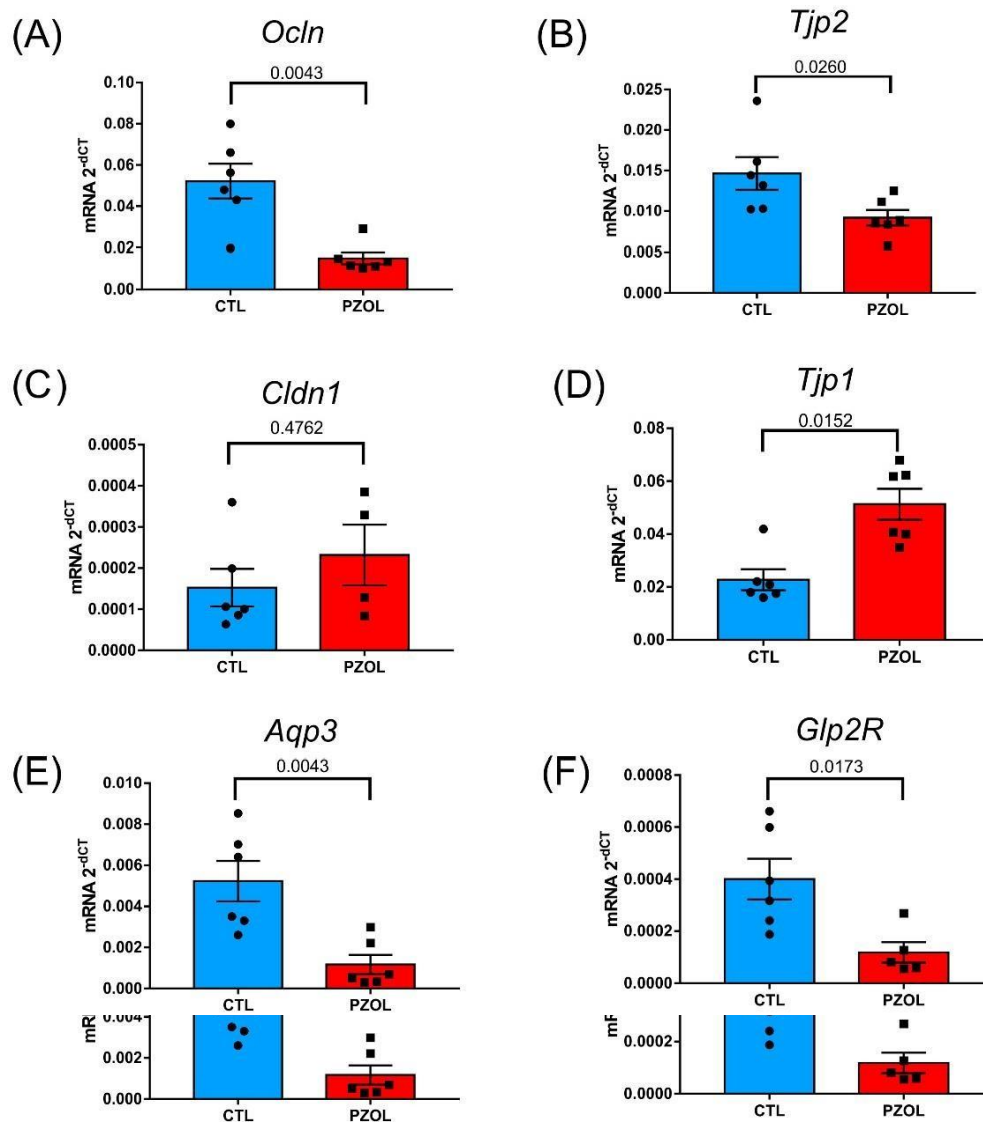


Figure 6. Pantoprazole induced alterations in mRNA of proteins from the epithelial barrier in ileum. mRNA levels of tight junction proteins (A) occludin (CTL: n = 6 and PZOL: n = 6), (B) ZO-2 (CTL: n = 4 and PZOL: n = 4), (C) claudin (CTL: n = 6 and PZOL: n = 4), (D) ZO-1 (CTL: n = 6 and PZOL: n = 6), (E) aquaporin 3 (CTL: n = 6 and PZOL: n = 6), (F) GLP2R (CTL: n = 6 and PZOL: n = 5). Mean $\pm$ standard deviation and t-test statistical comparisons.

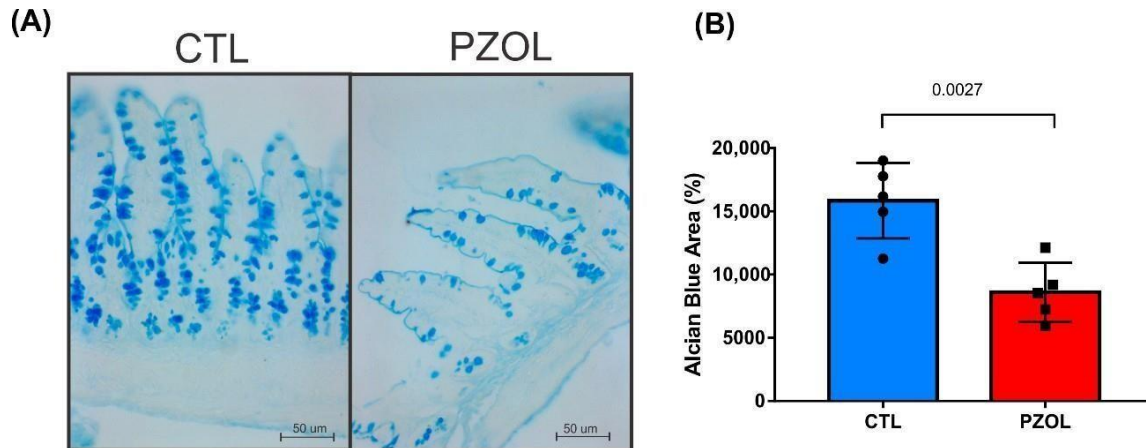


Figure 7. Pantoprazole induced loss of intestinal barrier functions. (A) Representative alcian blue(pH 2.5) stained section in the ileum: CTL and PZOL groups; (B) AB quantification graph of CTL and PZOL groups expressed as mean $\pm$ standard deviation *t*-test statistical comparisons. Images obtained with 20 $\times$ objective. (*n* = 5 animals per group).

In preliminary experiments, we investigated the effect of 30 days of pantoprazole on microbiota modulation and on intestinal permeability (Supplemental Figure S1A–C). The results showed that 30 days of pantoprazole did not change microbiota composition nor change proteins' levels of mucin (Supplemental Figure S1D,E).

2.3 Pantoprazole-Induced Liver Fibrosis and Inflammation

Next, we analyzed the effect of pantoprazole treatment in the liver of mice. The morphological analysis of the liver tissue via hematoxylin and eosin staining (Figure 8A) suggests that animals treated with pantoprazole for 60 days might have had microvesicular steatosis, but it is difficult to confirm with this staining. In order to confirm this finding, the hepatic content of neutral lipids was evaluated through Oil- Red-O (ORO) staining (Figure 8B). Our data revealed that the hepatic content of neutral lipids in the PZOL group was 60% higher than in the CTL group (CTL: 679,600 $\pm$ 99,270 and PZOL: 1,088,000 $\pm$ 147,100; *p*-value 0.0382; Figure 8C).

Furthermore, the analysis of collagen content in liver tissue (Figure 8D) showed that animals treated with pantoprazole for 60 days showed higher collagen labeling than animals in the respective control group (CTL: 5.082 $\pm$ 0.3889 and PZOL: 9.417 $\pm$ 0.3789; *p*-value < 0.0001; Figure 8E). Liver triglycerides (TG) contents in the PZOL group were increased compared to those in the CTL group (CTL: 7.14 $\pm$ 0.6351 and PZOL: 9.336 $\pm$ 1.731; *p*-value < 0.0159 Figure 8F). The evaluation of liver enzymes showed elevated serum values of ALT (CTL: 10.73 $\pm$ 2.0400 and PZOL: 13.32 $\pm$ 2.166; *p*-value < 0.0287 Figure 8G) but not AST (CTL: 18.62 $\pm$ 5.376 and PZOL:

17.98 ± 4.892; p-value < 0.8049 Figure 8H) in the PZOL group compared with the control group. Figure 7. Pantoprazole induced loss of intestinal barrier functions. (A) Representative alcian blue (pH 2.5) stained section in the ileum: CTL and PZOL groups; (B) AB quantification graph of CTL and PZOL groups expressed as mean ± standard deviation t-test statistical comparisons. Images obtained with 20× objective. (n = 5 animals per group). In preliminary experiments, we investigated the effect of 30 days of pantoprazole on microbiota modulation and on intestinal permeability (Supplemental Figure S1A–C). The results showed that 30 days of pantoprazole did not change microbiota composition nor change proteins' levels of mucin (Supplemental Figure S1D,E).

2.4. Pantoprazole-Induced Liver Fibrosis and Inflammation Next, we analyzed the effect of pantoprazole treatment in the liver of mice. The morphological analysis of the liver tissue via hematoxylin and eosin staining (Figure 8A) suggests that animals treated with pantoprazole for 60 days might have had microvesicular steatosis, but it is difficult to confirm with this staining. In order to confirm this finding, the hepatic content of neutral lipids was evaluated through Oil-Red-O (ORO) staining (Figure 8B). Our data revealed that the hepatic content of neutral lipids in the PZOL group was 60% higher than in the CTL group (CTL: 679,600 ± 99,270 and PZOL: 1,088,000 ± 147,100; p-value 0.0382; Figure 8C). Furthermore, the analysis of collagen content in liver tissue (Figure 8D) showed that animals treated with pantoprazole for 60 days showed higher collagen labeling than animals in the respective control group (CTL: 5.082 ± 0.3889 and PZOL: 9.417 ± 0.3789; p-value < 0.0001; Figure 8E). Liver triglycerides (TG) contents in the PZOL group were increased compared to those in the CTL group (CTL: 7.14 ± 0.6351 and PZOL: 9.336 ± 1.731; p-value < 0.0159 Figure 8F). The evaluation of liver enzymes showed elevated serum values of ALT (CTL: 10.73 ± 2.0400 and PZOL: 13.32 ± 2.166; p-value < 0.0287 Figure 8G) but not AST (CTL: 18.62 ± 5.376 and PZOL:

17.98 ± 4.892; p-value < 0.8049 Figure 8H) in the PZOL group compared with the control group.

The increase in systemic LPS in pantoprazole-treated mice might be responsible for the increase in liver inflammation and/or fibrosis. LPS is the ligand of TLR4, and thus, we decided to analyze the TLR4 signaling and inflammatory pathway. We performed TLR4, MYD88 and IRF3 gene expression analysis, and the results showed that the PZOL group had a clear increase in the expression of these three genes, compared to the CTL group (CTL: TLR4: 0.0005 ± 0.0001 and PZOL: 0.0012 ± 0.0003; p-value

0.0079; MYD88: CTL: $0.0003 \pm 8.785 \times 10^{-5}$ and PZOL: 0.0005 ± 0.0001 ; p-value 0.0152; IRF3: CTL: $8.674 \times 10^{-5} \pm 6.518 \times 10^{-5}$ and PZOL: 0.0004 ± 0.0003 ; p-value 0.0079; Figure 9A–C). Moreover, we also investigated the protein levels of TLR4, MyD88 and downstream signaling JNK phosphorylation. Pantoprazole-treated mice had increased TLR4 (CTL: 1.004 ± 0.1376 and PZOL: 1.34 ± 0.1557 ; p-value 0.0178) and MyD88 (CTL: 1.007 ± 0.046 and PZOL: 1.237 ± 0.162 p-value 0.0228) protein expression (Figure 9D) and increased JNK phosphorylation (Figure 9E). Furthermore, we observed an increase in TGF β (CTL: 1.017 ± 0.2817 and PZOL: 2.122 ± 0.452 ; p-value < 0.0092) and in its receptor (TGF β R: CTL: 0.9889 ± 0.1281 and PZOL: 1.896 ± 0.5311 ; p-value 0.020) in pantoprazole-treated mice (Figure 9E).

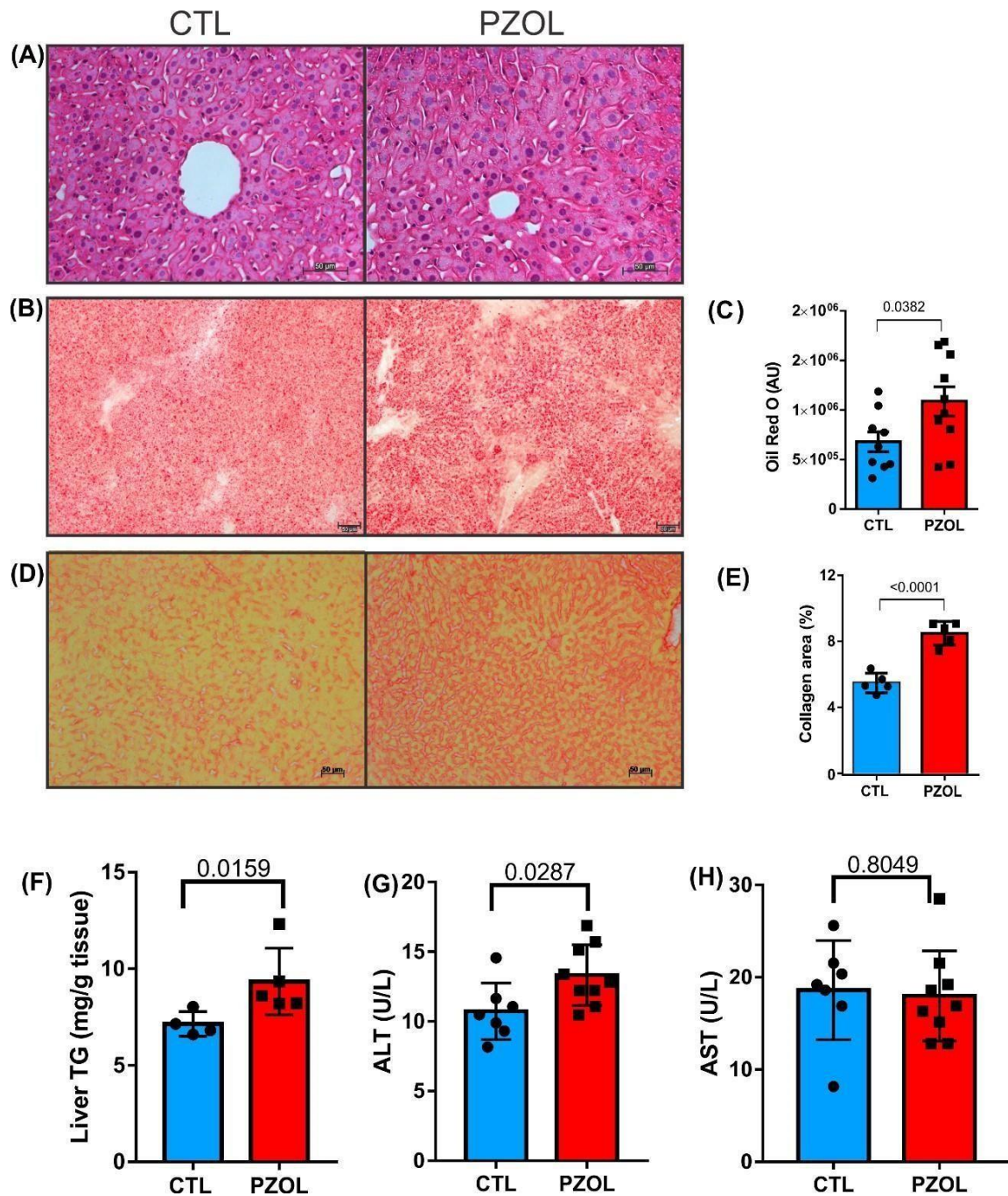


Figure 8. Pantoprazole induced liver inflammation and fibrosis. (A) Representative HE images: CTL and PZOL groups; (B) representative ORO images: CTL and PZOL groups; (C) ORO quantification graph of CTL ($n = 9$) and PZOL ($n = 10$); (D) representative PS images; (E) PS quantification graph of CTL ($n = 5$) and PZOL ($n = 5$) groups. Images obtained with 20 $\times$ objective. (F) Liver TG quantification graph of CTL ($n = 4$) and PZOL ($n = 4$) groups. (G,H) Serum ALT and AST quantification graph of CTL ($n = 7$) and PZOL groups ($n = 9$). Mean $\pm$ standard deviation and t -test statistical comparisons.

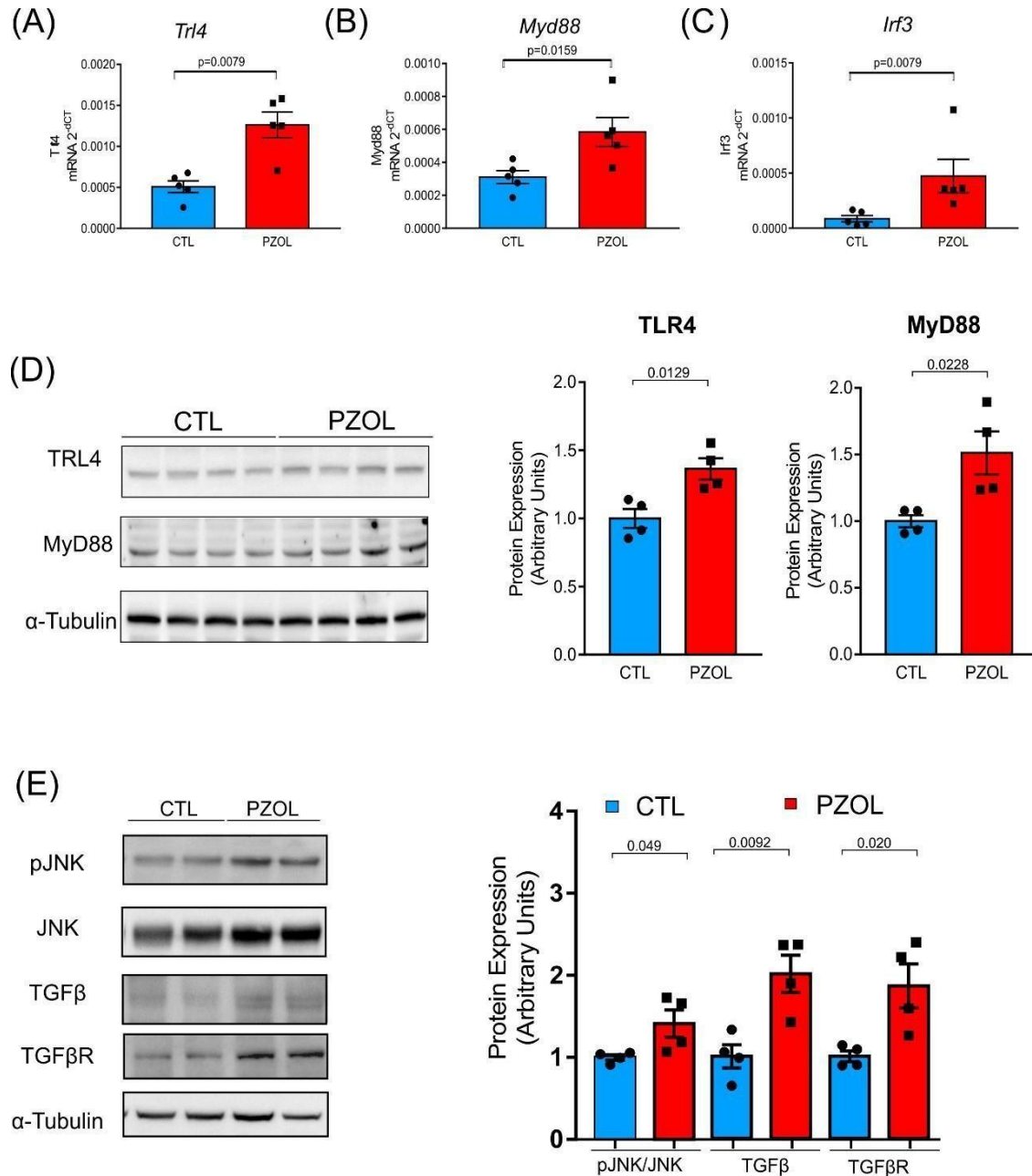


Figure 9. Inflammatory and TGF β signaling in liver of pantoprazole-treated mice. mRNA levels of (A) *TLR4*; (B) *MyD88*; (C) *IRF3* ($n = 5$ animals per group); (D) representative Western blots of TLR4 and MyD88; and quantification of the Western blots ($n = 4$ animals per group); (E) representative Western blots of phosphorylated JNK and total TGF β , TGF β receptor and of α -tubulin of CTL and PZOL- treated mice and quantification of the Western blots ($n = 4$ animals per group). Mean $\pm$ standard deviation and t -test statistical comparisons.

3. Discussion

The present study demonstrated that chronic treatment with PPIs induces clear changes in intestinal microbiota and the intestinal barrier. Additionally, the impairment on intestinal barrier integrity was associated with an increase in LPS circulating levels, which activates a hepatic signaling cascade in the liver, accompanied by an increase in liver microvesicular steatosis and fibrosis. Our data are in accordance with Takashima et al., who demonstrated that PPIs enhance intestinal permeability, associated with changes in microbiota composition [36]. However, in our study, we went further and investigated the implications of these changes in intestinal permeability and dysbiosis on hepatic injury.

The microbiota composition in the gastric fluid of PPI-treated animals and humans showed an increase in microbial diversity [14,22,37,38]. Our results demonstrated an increase in alpha diversity in the feces of mice after 60 days of PPI treatment. This is an expected result since the main action of PPIs is to reduce gastric acid secretion, inducing an increase in gastric pH. In some studies, microbiota composition in the feces was also investigated, and although not uniformly observed, most studies showed that the chronic use of PPIs modulates microbiota diversity and the abundance of commensals in the colon [14,22,37–39].

The changes in microbiota induced by pantoprazole were dramatic, starting at the phylum level with an increase in the abundance of Firmicutes and Proteobacteria, a reduction in the Bacteroidetes and significant increase in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio, which is a marker of inflammatory processes [23]. The alteration of the Proteobacteria phylum was marked by the increase in bacteria of the *Bilophila* and *Helicobacter* genus. The *Bilophila* genus have already been described in association with the loss of intestinal barrier function, inflammation, alterations in glucose metabolism and hepatic steatosis [39]. *Helicobacter* can indirectly induce insulin resistance (IR) and NAFLD by generating chronic inflammation or directly by activating signaling pathways [40].

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is strictly dependent on intragastric pH since it enters the replicative phase at pH 6–7, and at pH 3–6, it transforms into its coccoid form, which is resistant to antibiotics [41]. In this way, previous to the use of antibiotics to treat *H. Pylori*, it is recommended to treated patients with PPIs in order to change H pylori form from the resistant to the replication phase, in which it is more susceptible to the action of the antibiotic.

It is important to emphasize that these changes in microbiota were accompanied by an increase in circulating levels of LPS. Firmicutes and Proteobacteria are two main phyla that have LPS in plasma membrane, and these two phyla were increased in PPI-treated mice.

Although LPS has a role in the development of insulin resistance (IR), this hormonal resistance has more complex mechanisms, which are not limited to modulations of microbiota [29–31]. Although pantoprazole induced marked changes in microbiota and in portal and cava LPS levels, we did not observe systemic IR. On the other hand, there was an improvement in insulin sensitivity associated with a reduction in fasting glucose levels. These improvements in insulin sensitivity and in glucose metabolism have also been described in type 2 diabetic patients using PPIs [39]. Although we did not investigate the molecular mechanism for this improvement in insulin sensitivity, previous data showed that the increase in gastrin levels induced by PPIs possibly acts as an incretin mimetic, improving insulin secretion and glucose metabolism [42–44].

Previous data showed that under normal conditions, gastric acid acts as a kind of barrier, impairing the progression down to the lower GI tract of bacteria not well-adapted to low pH [37]. Treatment with PPIs removes this barrier, allowing colonization by these bacteria, which can also influence the ecological equilibrium of the microbiota in the lower GI tract. Another mechanism by which PPIs can alter microbiota is through a direct antimicrobial effect of PPIs, acting in ATPases of bacteria, which are very similar to the human H⁺/K⁺ ATPase targeted by PPIs [45]. However, since we only observed changes in microbiota after 60 days of PPIs, we can suggest that the changes in pH might have the main role in the modulation of microbiota.

PPIs induce a clear alteration in the epithelial intestinal barrier, characterized by a decrease in tight junction proteins, also associated with a decrease in adherents' proteins. The decrease in tight junction proteins such as occludin may be a

consequence of reduced synthesis. However, ZO-1 protein reduction certainly is independent of mRNA, which was increased, probably trying to compensate the reduction in protein tissue levels. In parallel, there was also a decrease in the mRNA of aquaporin 3 and of the receptor of GLP2, which are also important for the integrity of the intestinal barrier [46–48].

The alterations in the intestinal barrier have consequences in liver lipid storage and inflammation. Our data showed that the use of PPIs for 60 days can mildly increase the accumulation of TG in liver and also the serum values of ALT. PPI induced microvesicular steatosis, which might be a more severe form of steatosis [49]. In accordance, there was also an increase in markers of liver fibrosis [50]. Previous data showed that dysbiosis in the gut could influence liver fibrosis [50–52] through the translocation of bacteria and/or their products across the intestinal barrier. In this regard, the increase in circulating levels of LPS in the portal vein probably contributed to the increased fibrosis. LPS binds to TLR4 in the liver and induces signaling pathways characterized by an increase in IKK β /NF κ B [53] and JNK activation. Our data showing an increase in the phosphorylation of these two serine kinases indicates an increase in LPS signaling in the liver of PPI-treated mice. Previous data showed that the blockade of TLR4 signaling or the use of antibiotics that reduce the microbiota improves experimental liver fibrosis [51]. It is important to mention that TLR4 signaling to the nucleus uses NF κ B through IKK β , AP-1 through JNK and IRF3 directly, and these three pathways were activated in the livers of PPI-treated mice [53].

TLR4 is expressed in different cells in the liver, including hepatocytes, hepatic stellate cells (HSCs), and Kupffer cells. In HSCs, TLR4 can activate a fibrogenic phenotype, producing chemokines and adhesion molecules that recruit Kupffer cells [31,51,52]. The Kupffer cells increase TGF β production, which will activate fibrogenesis. Our data show that this mechanism is probably operating in the liver of pantoprazole-treated mice because, in addition to the activation of downstream TLR4 signaling, we also observed an increase in TGF β tissue levels in these mice.

Different from our data, a previous report by Lu et al. showed that pantoprazole improved liver fibrosis and suppressed hepatic stellate cell activation in mice. In addition, they also showed in cells that PPIs can downregulate hepatic fibrogenic gene expression via YAP (Yes-associated protein). However, it is important to mention that there are clear methodological differences between our data and this

study that can explain the discrepancy in the results. First, in their study, Lu et al. used PPIs for fourteen days in mice, which is probably not sufficient to induce changes in intestinal microbiota and/or in intestinal permeability. The model they used of hepatic injury is completely different from ours, and some of their results are obtained in cell culture. In preliminary experiments, we showed that 30 days of PPIs was not able to change microbiota or intestinal permeability. This explains why we used PPI for 60 days. In this regard, we can suggest that although PPIs for short periods or in vitro can have protective effects on hepatic fibrosis, long-term PPI use can induce dysbiosis, change intestinal permeability and induce hepatic steatosis and fibrosis.

Our data showing that the long-term use of PPIs can alter microbiota and intestinal permeability and contribute to induce microvesicular steatosis and fibrosis are important as an initial model for the study of these interactions in vivo. However, it is important that future studies also investigate the effects of long-term PPIs on animal models of heartburn or GERD.

In summary, our data showed that chronic treatment with pantoprazole induced the modulation of microbiota which was not associated with IR. However, the alteration in intestinal permeability, associated with the increase in circulating levels of LPS, TLR4 downstream signaling and TGF β , may have an important role in the increased microvesicular steatosis and fibrosis. Finally, this model of PPI-induced changes in microbiota might be useful to investigate liver microvesicular steatosis and fibrosis.

4. Materials and Methods

4.1 Animal Characterization

All animal handling and experiments were performed following the National Institute of Health guidelines for the use of experimental animals and were approved by the Care of Animals and Ethical Committee for Animal Research of the State University of Campinas.

(CEUA Protocol 4924-1/2018). To carry out the study, male C57BL/6J mice were provided by the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science— University of Campinas (Campinas, SP, Brazil). Mice were kept in the animal facility with a constant light/dark cycle (12 h/12 h), room temperature (22 °C) and humidity, and they received standard rodent chow (3.39 kcal/g; Nuvilab CR-1, Nuvital Quimtia, (Colombo, PR, Brazil) and water ad libitum. After 1 week of acclimation, 8–12-week-old mice were randomly divided into two experimental groups. Control mice (CTL, $n \geq 8$) were fed with standard rodent chow and had free access to drinking water and supplement with vehicle by gavage three times a week. Pantoprazole-treated mice (PZOL, $n \geq 8$) were fed with standard rodent chow and free access to water and supplement with a dose of 150 mg/kg of pantoprazole by gavage three times a week, on Mondays, Wednesdays and Fridays.

4.2. Glucose and Insulin Tolerance Test

For the GTT, mice were fasted overnight and received an intraperitoneal (IP) injection of glucose (1 g/kg). Blood samples were collected from the tail, and the glucose level was determined using a glucose monitor (Glucometer; Bayer, Tarrytown, NY, USA) immediately before IP injection and after 30, 60, 90 and 120 min. For the ITT, mice fasted for six hours received an IP injection of insulin (1.5 IU/kg). Blood samples were collected from the tail, and glucose was measured with a glucometer immediately before IP injection and after 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min. Insulin tolerance was assessed by glucose clearance over the initial minutes of the insulin challenge and through the rate constant for plasma glucose disappearance (Kitt) [54].

4.3. Serum Dosage of LPS

Serum samples were obtained from the cava vein and portal vein and diluted to 20% (vol./vol.) with endotoxin-free water and then heated at 70 °C for 10 min to inactivate serum proteins. Then, LPS was quantified using a commercial Limulus Amebocyte Assay kit (Cambrex, Walkersville, MD, USA) according to the manufacturer's protocol, as previously described [55].

4.4. TG, ALT, and AST

Determination Liver samples were subjected to lipid extraction as previously described [56,57]. Briefly, the samples were homogenized in a solution containing chloroform and methanol using the BeadBlaster 24 microtube homogenizer (Benchmark Scientific, Inc., Sayreville, NJ, USA) and gently shook overnight at 4 °C. After the incubation, the samples were added with 0.6% NaCl solution and centrifuged (4000× g for 20 min at 4 °C) for removal of the organic layer. The organic fraction was dried at room temperature, reconstituted in 100 µL of isopropanol and used for triglycerides' (TGs') quantification with an enzymatic/colorimetric kit (LABORLAB, Sao Paulo, SP, Brazil). Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured with the kinetic UV method using the ALT (GPT) or AST (GOT) Liquid Stable Reagent according to the manufacturer's specifications (LABORLAB, Sao Paulo, SP, Brazil).

4.5. Tissue Extraction for Immunoblotting

Mice were fasted for 6 h before procedures. Mice were anesthetized with an intraperitoneal administration of ketamine (100 mg/kg) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg), and after the loss of foot, tail and corneal reflexes, they were utilized. Liver and intestine fragments (~100 mg) were collected and homogenized in extraction buffer (10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris (pH 7.4), containing 100 mmol/L sodium pyrophosphate, 100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol/L PMSF and 0.1 mg of aprotinin/mL, 1% Triton-X 100). Samples

were centrifuged at 11,000 rpm and 4 °C, and the supernatants were used. The samples were subjected to electrophoresis and Western blotting. The primary antibodies used were anti-phospho-JNK (sc-6254 Santa Cruz), anti-Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 13766 14 of 18 phospho-IkB α (sc-7977 Santa Cruz), anti-JNK (sc-1648 Santa Cruz), anti-TGF β (ab92486 Abcam), anti-TGF β Receptor (ab31013 Abcam), anti-TLR4 (ab22048 Abcam), anti-Myd88 (sc-11356 Santa Cruz), anti-ZO-1 (61-7300 Thermo Fisher), anti-Occludin (71-1500 Thermo Fisher), anti-Claudin 1 (#13995 Cell Signalling), anti-E-cadherin (sc-7870 Santa Cruz), anti-Beta catenin (sc-1496 Santa Cruz), anti- α -tubulin (#2144 Cell Signalling) and anti- β -actin (#4967 Cell Signalling) at 1:1000 dilution. The secondary antibody (Thermo Scientific) linked to a peroxidase molecule, at 1:10,000 dilution, reacted with the chemiluminescence solution (Clarity™ Western ECL substrate kit, BioRad ©), and the membranes were developed in photodocumentation (Gel Doc™ XR, BioRad ©), generating digital files. Later, images were analyzed using the ImageLab software (v. 5.2.1 build 11, BioRad © Laboratories).

4.6. Histology and Morphometric

Analysis Liver fragments were fixed at room temperature by immersion in 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, dehydrated, bleached and embedded in paraffin [58]. Five micrometer sections were stained with hematoxylin and eosin to analyze the liver morphology or Picro Sirius red (PS) solution to assess the presence or absence of liver fibrosis through the quantification of the interstitial collagen content. The interstitial collagen area was determined for the entire PS-stained liver section by using digitized images captured using the Axio Scope A1 microscope with an Axio Cam MRc digital camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and the Axio Vision Release 4.8.2 software. Colored images were converted to 8 bit, and a default B&W was set. Since we assumed a constant background signal (threshold) for all images, the percentage of positive area for the PS staining of each field was recorded. On average, 15 fields were analyzed for animals under a 20 $\times$ objective. Liver sections for neutral lipid staining with ORO were obtained and processed based on previous studies [59,60]. Briefly, liver fragments were embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound and immediately frozen in n-hexane with liquid nitrogen (N₂). Fifteen micrometer serial cryostat sections

were mounted onto aminopropyltriethoxysilane-coated glass slides. Three sections from different parts of the samples (200 μ m apart) were disposed per slide, and two slides per animal were analyzed. Liver sections were incubated with ORO for 10 min at room temperature and then rinsed with tap water for 30 min. After rinsing, a water-soluble mounting medium was used prior to observation via microscopy. Four different fields of each section were acquired with an Olympus BX51TF microscope equipped with a digital camera (DP72, Olympus, Tokyo, Japan) under a 20 $\times$ objective. Colored images were converted to 8 bit. Thereafter, a default red was set, and the threshold was adjusted to evaluate the optical density of the positive area for ORO staining of each field. An individual background signal was assumed for each image. All histological analyses were performed using the ImageJ software (version 1.53e). The ileum was collected from animals, and this intestinal segment was cleaned and longitudinally opened with the luminal side facing upward. Gently and slowly, the ileum was wrapped around the toothpick to form a Swiss roll. Once the entire length of the ileum was rolled, we placed it into a tissue cassette and fixed it at room temperature by immersion in 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, dehydrated, bleached and embedded in paraffin [61]. In each cassette, we had an ileum Swiss roll from three different mice. Five micrometer sections were stained with alcian blue pH 2.5 (AB) to stain the mucus. Digitalized images were captured using the Axio Scope A1 microscope with an Axio Cam MRc digital camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and the Axio Vision Release 4.8.2 software. Colored images were converted to 8 bit, and a default B&W was set. The percent of mucus-stain-positive area per microvilli area was measured. All histological analyses were performed using the ImageJ software (version 1.53e).

4.7. Microbiota Analysis

Fecal samples were collected directly from the rectal ampulla after (n = 8) the treatment period and were stored at -80 $^{\circ}$ C until the analysis. Samples were collected, stored and processed in a controlled environment to minimize the risk of contamination. The genomic DNA was extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A negative control (water from QIAamp DNA Stool Mini Kit) was used from an extraction step to the final sequencing, and a mock microbial DNA

community standard was used as a positive control (ZymoBIOMICS Irvine, CA, USA). For each sample, the V3–V4 hyper-variable region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified followed by Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation guide [62]. The taxonomic composition of the bacterial communities was obtained by analyzing the V3–V4 region of the 16S rRNA gene using the Illumina® MiSeq platform. The constructions of the DNA sequencing libraries were performed according to the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA) [62] and followed the same flow described by Caporaso et al. (2012) [63]. The fastq sequences were analyzed using the Illumina 16S Metagenomics software which performs the taxonomic classification of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene using the DADA2 database (accessed on June 2020) [64]. Paired abundance analyses were performed using the IBM SPSS® 20.0 software (Wilcoxon Signed Ranks Test). The analysis of alpha and beta diversity was performed using the MicrobiomeAnalyst [65,66]. The graphs were generated using GraphPad Prism 7.0.

4.8. qPCR

Total RNA was obtained from the ileum, colon, and liver from both groups of mice using RNeasy Mini Kit from Qiagen as described in the manufacturer's protocol (Qiagen Inc, CA, USA). For tissue samples, the first-strand cDNA was synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit as described in the manufacturer's protocol (Applied Biosystem, CA, USA). TaqMan and Quant Studio 6 Flex Real-Time PCR System and Data Assist™ software Applied Biosystems, CA, USA) were used to get the relative expression levels of the genes: *Ocln* Mm00500912_m1; *Tjp2* Mm00495620_m1; *Cldn1* Mm00516701_m1; *Tjp1* Mm00493699_m1; *Aqp3* Mm01208560_m1; *Glpr2* Mm01329475_m1. SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystem, CA, USA) was used to get the relative expression levels of the genes: 150 nM of *Tlr4* (Fw: 50 -GGCCATTGCTGCCAACAT -30 ; Rv: 50 - CAACAATCACCTTTCGGCTTTT -30), 150 nM of *MyD88* forward and reverse primers (Fw: 5'-TCGATGCCTTCATCTGCTATTG -30 ; Rv: 50 - GGT CGGATCATCTCCTGCACAAA -30) and 150 nM of *Irf3* (Fw: 50 -TTCCCGGGAGGGATAAGC -30 ; Rv: 50 - GGGCAGAGCGGAAATTCC -30) [53]. *Gapdh* and *B2m* expression were used as endogenous control, and samples from control mice were used as calibrators. A negative "No Template Control" was also

included for each primer pair.

4.9. Statistical Analyses

The data were expressed as means $\pm$ standard deviation. For statistical analysis, the groups were compared using Student's t-test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Supplementary Materials: The following supporting information can be download at: www.mdpi.com/xxx/s1.

Author Contributions: Conceptualization, M.J.A.S.; methodology, H.B.A., K.C.G.D.A., D.G., A.S., C.J.T., S.B. and G.Z.R.; project administration, H.B.A. and D.G.; supervision, M.J.A.S.; writing— original draft, H.B.A.; writing—review and editing, A.S., G.Z.R. and M.J.A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from INCT Obesidade e Diabetes CNPq (465693/2014-8) and FAPESP (2014/50907-5; 2019/03196-0; 2020/06397- 3).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the National Institute of Health guidelines for the use of experimental animals and approved by the Care of Animals and Ethical Committee for Animal Research of the State University of Campinas (CEUA Protocol 4924-1/2018).

Informed Consent Statement: Not applicable. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 13766 16 of 18

Data Availability Statement: BioProject accession number PRJNA751763 (www.ncbi.nlm.nih.gov (accessed on 3 August 2021)).

Acknowledgments: This present study is dedicated to the memory of Jósimo Pinheiro. This work was supported by grants from the INCT Obesidade e Diabetes CNPq (465693/2014-8) and FAPESP (2014/50907-5; 2019/03196-0; 2020/06397- 3).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Scarpignato, C.; Pelosini, I.; Di Mario, F. Acid suppression therapy: Where do we go from here? *Dig. Dis.* **2006**, *24*, 11–46. [\[CrossRef\]](#)
2. DeVault, K.R.; Castell, D.O.; Gastroenterology, A.C.o. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am. J. Gastroenterol.* **2005**, *100*, 190–200. [\[CrossRef\]](#)
3. Sharma, V.K.; Leontiadis, G.I.; Howden, C.W. Meta-analysis of randomized controlled trials comparing standard clinical doses of omeprazole and lansoprazole in erosive oesophagitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2001**, *15*, 227–231. [\[CrossRef\]](#)
4. Suzuki, H.; Okada, S.; Hibi, T. Proton-pump inhibitors for the treatment of functional dyspepsia. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2011**, *4*, 219–226. [\[CrossRef\]](#)
5. Bardou, M.; Toubouti, Y.; Benhabrou-Brun, D.; Rahme, E.; Barkun, A.N. Meta-analysis: Proton-pump inhibition in high-risk patients with acute peptic ulcer bleeding. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2005**, *21*, 677–686. [\[CrossRef\]](#)
6. Islam, M.M.; Poly, T.N.; Walther, B.A.; Dubey, N.K.; Anggraini Ningrum, D.N.; Shabbir, S.A.; Jack Li, Y.C. Adverse outcomes of long-term use of proton pump inhibitors: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *30*, 1395–1405. [\[CrossRef\]](#)
7. de la Caba Ortiz, C.; Argüelles Arias, F.; Martín de Argila de Prados, C.; Júdez Gutiérrez, J.; Linares Rodríguez, A.; Ortega Alonso, A.; Rodríguez de Santiago, E.; Rodríguez-Téllez, M.; Vera Mendoza, M.I.; Aguilera Castro, L.; et al. Proton-pump inhibitors adverse effects: A review of the evidence and position statement by the Sociedad Española de Patología Digestiva. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **2016**, *108*, 207–224. [\[CrossRef\]](#)
8. Eom, C.S.; Jeon, C.Y.; Lim, J.W.; Cho, E.G.; Park, S.M.; Lee, K.S. Use of acid-suppressive drugs and risk of pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *CMAJ* **2011**, *183*, 310–319. [\[CrossRef\]](#)
9. Malfertheiner, P.; Kandulski, A.; Venerito, M. Proton-pump inhibitors: Understanding the complications and risks. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 697–710. [\[CrossRef\]](#)
10. Cheung, K.S.; Chan, E.W.; Wong, A.Y.S.; Chen, L.; Wong, I.C.K.; Leung, W.K. Long-term proton pump inhibitors and risk of gastric cancer development after treatment for. *Gut* **2018**, *67*, 28–35. [\[CrossRef\]](#)
11. Song, H.; Zhu, J.; Lu, D. Long-term proton pump inhibitor (PPI) use and the development of gastric pre-malignant lesions. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, *12*, CD010623. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Sung, J.; Kim, N.; Lee, J.; Hwang, Y.J.; Kim, H.W.; Chung, J.W.; Kim, J.W.; Lee, D.H. Associations among Gastric Juice pH, Atrophic Gastritis, Intestinal Metaplasia and. *Gut Liver* **2018**, *12*, 158–164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Correa, P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* **1995**, *19* (Suppl. S1), S37–S43. [\[PubMed\]](#)
14. Tsuda, A.; Suda, W.; Morita, H.; Takanashi, K.; Takagi, A.; Koga, Y.; Hattori, M. Influence of Proton-Pump Inhibitors on the Luminal Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2015**, *6*, e89. [\[CrossRef\]](#)
15. Freedberg, D.E.; Toussaint, N.C.; Chen, S.P.; Ratner, A.J.; Whittier, S.; Wang, T.C.; Wang, H.H.; Abrams, J.A. Proton Pump Inhibitors Alter Specific Taxa in the Human Gastrointestinal Microbiome: A Crossover Trial. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 883–885.e889. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Takagi, T.; Naito, Y.; Inoue, R.; Kashiwagi, S.; Uchiyama, K.; Mizushima, K.; Tsuchiya, S.; Okayama, T.; Dohi, O.; Yoshida, N.; et al. The influence of long-term use of proton pump inhibitors on the gut microbiota: An age-sex-matched case-control study. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2018**, *62*, 100–105. [\[CrossRef\]](#)
17. Jandhyala, S.M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Nageshwar Reddy, D. Role of the normal gut microbiota. *World. J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 8787–8803. [\[CrossRef\]](#)
18. Singh, A.; Cresci, G.A.; Kirby, D.F. Proton Pump Inhibitors: Risks and Rewards and Emerging Consequences to the Gut Microbiome. *Nutr. Clin. Pract.* **2018**, *33*, 614–624. [\[CrossRef\]](#)
19. Minalyan, A.; Gabrielyan, L.; Scott, D.; Jacobs, J.; Pisegna, J.R. The Gastric and Intestinal Microbiome: Role of Proton Pump Inhibitors. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2017**, *19*, 42. [\[CrossRef\]](#)
20. Imhann, F.; Vich Vila, A.; Bonder, M.J.; Lopez Manosalva, A.G.; Koonen, D.P.Y.; Fu, J.; Wijmenga, C.; Zhernakova, A.; Weersma, R.K. The influence of proton pump inhibitors and other commonly used medication on the gut microbiota. *Gut Microbes* **2017**, *8*, 351–358. [\[CrossRef\]](#)

21. Bruno, G.; Zaccari, P.; Rocco, G.; Scalese, G.; Panetta, C.; Porowska, B.; Pontone, S.; Severi, C. Proton pump inhibitors and dysbiosis: Current knowledge and aspects to be clarified. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 2706–2719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Imhann, F.; Bonder, M.J.; Vich Vila, A.; Fu, J.; Mujagic, Z.; Vork, L.; Tigchelaar, E.F.; Jankipersadsing, S.A.; Cenit, M.C.; Harmsen, H.J.; et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut* **2016**, *65*, 740–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Saad, M.J.; Santos, A.; Prada, P.O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology* **2016**, *31*, 283–293. [[CrossRef](#)]
24. Tsukumo, D.M.; Carvalho, B.M.; Carvalho Filho, M.A.; Saad, M.J. Translational research into gut microbiota: New horizons on obesity treatment: Updated 2014. *Arch. Endocrinol. Metab.* **2015**, *59*, 154–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Carvalho, B.M.; Saad, M.J. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. *Mediators Inflamm.* **2013**, *2013*, 986734. [[CrossRef](#)]
26. Jiao, N.; Baker, S.S.; Nugent, C.A.; Tsompana, M.; Cai, L.; Wang, Y.; Buck, M.J.; Genco, R.J.; Baker, R.D.; Zhu, R.; et al. Gut microbiome may contribute to insulin resistance and systemic inflammation in obese rodents: A meta-analysis. *Physiol. Genomics* **2018**, *50*, 244–254. [[CrossRef](#)]
27. Zhi, C.; Huang, J.; Wang, J.; Cao, H.; Bai, Y.; Guo, J.; Su, Z. Connection between gut microbiome and the development of obesity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *38*, 1987–1998. [[CrossRef](#)]
28. Michelotti, G.A.; Machado, M.V.; Diehl, A.M. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10*, 656–665. [[CrossRef](#)]
29. Younossi, Z.; Anstee, Q.M.; Marietti, M.; Hardy, T.; Henry, L.; Eslam, M.; George, J.; Bugianesi, E. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *15*, 11–20. [[CrossRef](#)]
30. Friedman, S.L.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Rinella, M.; Sanyal, A.J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 908–922. [[CrossRef](#)]
31. Kolodziejczyk, A.A.; Zheng, D.; Shibolet, O.; Elinav, E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol. Med.* **2019**, *11*, e9302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pyo, J.H.; Kim, T.J.; Lee, H.; Choi, S.C.; Cho, S.J.; Choi, Y.H.; Min, Y.W.; Min, B.H.; Lee, J.H.; Kang, M.; et al. Proton pump inhibitors use and the risk of fatty liver disease: A nationwide cohort study. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *36*, 1235–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Llorente, C.; Jepsen, P.; Inamine, T.; Wang, L.; Bluemel, S.; Wang, H.J.; Loomba, R.; Bajaj, J.S.; Schubert, M.L.; Sikaroodi, M.; et al. Gastric acid suppression promotes alcoholic liver disease by inducing overgrowth of intestinal *Enterococcus*. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 837. [[CrossRef](#)]
34. Lee, S.M.; Kim, N.; Nam, R.H.; Park, J.H.; Choi, S.I.; Park, Y.T.; Kim, Y.R.; Seok, Y.J.; Shin, C.M.; Lee, D.H. Gut microbiota and butyrate level changes associated with the long-term administration of proton pump inhibitors to old rats. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6626. [[CrossRef](#)]
35. McMurdie, P.J.; Holmes, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Takashima, S.; Tanaka, F.; Kawaguchi, Y.; Usui, Y.; Fujimoto, K.; Nadatani, Y.; Otani, K.; Hosomi, S.; Nagami, Y.; Kamata, N.; et al. Proton pump inhibitors enhance intestinal permeability via dysbiosis of gut microbiota under stressed conditions in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* **2020**, *32*, e13841. [[CrossRef](#)]
37. Jackson, M.A.; Goodrich, J.K.; Maxan, M.E.; Freedberg, D.E.; Abrams, J.A.; Poole, A.C.; Sutter, J.L.; Welter, D.; Ley, R.E.; Bell, J.T.; et al. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut* **2016**, *65*, 749–756. [[CrossRef](#)]
38. Amir, I.; Konikoff, F.M.; Oppenheim, M.; Gophna, U.; Half, E.E. Gastric microbiota is altered in oesophagitis and Barrett's oesophagus and further modified by proton pump inhibitors. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16*, 2905–2914. [[CrossRef](#)]
39. Natividad, J.M.; Lamas, B.; Pham, H.P.; Michel, M.L.; Rainteau, D.; Bridonneau, C.; da Costa, G.; van Hylckama Vlieg, J.; Sovran, B.; Chamignon, C.; et al. *Bifidobacterium wadsworthii* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2802. [[CrossRef](#)]
40. Chen, C.; Zhang, C.; Wang, X.; Zhang, F.; Zhang, Z.; Ma, P.; Feng, S. *Helicobacter pylori* infection may increase the severity of nonalcoholic fatty liver disease via promoting liver function damage, glycometabolism, lipid metabolism, inflammatory reaction and metabolic syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *32*, 857–866. [[CrossRef](#)]
41. Ierardi, E.; Losurdo, G.; Fortezza, R.F.; Principi, M.; Barone, M.; Leo, A.D. Optimizing proton pump

- inhibitors in. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 5097–5104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Peng, C.C.; Tu, Y.K.; Lee, G.Y.; Chang, R.H.; Huang, Y.; Bukhari, K.; Tsai, Y.C.; Fu, Y.; Huang, H.K.; Munir, K.M. Effects of Proton Pump Inhibitors on Glycemic Control and Incident Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2021**, *106*, 3354–3366. [[CrossRef](#)]
 43. Singh, P.; Indaram, A.; Greenberg, R.; Visvalingam, V.; Bank, S. Long term omeprazole therapy for reflux esophagitis: follow-up in serum gastrin levels, EC cell hyperplasia and neoplasia. *World J. Gastroenterol.* **2000**, *6*, 789–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 44. Suarez-Pinzon, W.L.; Lakey, J.R.; Rabinovitch, A. Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin induces beta-cell neogenesis from pancreatic duct cells in human islets transplanted in immunodeficient diabetic mice. *Cell Transplant.* **2008**, *17*, 631–640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 45. Ajdić, D.; McShan, W.M.; McLaughlin, R.E.; Savić, G.; Chang, J.; Carson, M.B.; Primeaux, C.; Tian, R.; Kenton, S.; Jia, H.; et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14434–14439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 46. Zihni, C.; Mills, C.; Matter, K.; Balda, M.S. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 564–580. [[CrossRef](#)]
 47. azzo, E.; Gestic, M.A.; Utrini, M.P.; Chaim, F.D.; Geloneze, B.; Pareja, J.C.; Chaim, E.A.; Magro, D.O. GLP-2: A poorly understood mediator enrolled in various bariatric/metabolic surgery-related pathophysiologic mechanisms. *Arq. Bras. Cir. Dig.* **2016**, *29*, 272–275. [[CrossRef](#)]
 48. Covasa, M.; Stephens, R.W.; Todorean, R.; Cobuz, C. Intestinal Sensing by Gut Microbiota: Targeting Gut Peptides. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 82. [[CrossRef](#)]
 49. Tandra, S.; Yeh, M.M.; Brunt, E.M.; Vuppalanchi, R.; Cummings, O.W.; Ünalp-Arida, A.; Wilson, L.A.; Chalasani, N. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 654–659. [[CrossRef](#)]
 50. Henderson, N.C.; Rieder, F.; Wynn, T.A. Fibrosis: From mechanisms to medicines. *Nature* **2020**, *587*, 555–566. [[CrossRef](#)]
 51. Seki, E.; De Minicis, S.; Osterreicher, C.H.; Kluwe, J.; Osawa, Y.; Brenner, D.A.; Schwabe, R.F. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1324–1332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 52. Paik, Y.H.; Schwabe, R.F.; Bataller, R.; Russo, M.P.; Jobin, C.; Brenner, D.A. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* **2003**, *37*, 1043–1055. [[CrossRef](#)]
 53. Sharifnia, T.; Antoun, J.; Verriere, T.G.; Suarez, G.; Wattacheril, J.; Wilson, K.T.; Peek, R.M.; Abumrad, N.N.; Flynn, C.R. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2015**, *309*, G270–G278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 54. Bezerra, R.M.; Ueno, M.; Silva, M.S.; Tavares, D.Q.; Carvalho, C.R.; Saad, M.J.; Gontijo, J.A. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2001**, *34*, 1155–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 55. Guadagnini, D.; Rocha, G.Z.; Santos, A.; Assalin, H.B.; Hirabara, S.M.; Curi, R.; Oliveira, A.G.; Prada, P.O.; Saad, M.J.A. Microbiota determines insulin sensitivity in TLR2-KO mice. *Life Sci.* **2019**, *234*, 116793. [[CrossRef](#)]
 56. de Souza, D.N.; Teixeira, C.J.; Veronesi, V.B.; Murata, G.M.; Santos-Silva, J.C.; Hecht, F.B.; Vicente, J.M.; Bordin, S.; Anhê, G.F. Dexamethasone programs lower fatty acid absorption and reduced PPAR-γ and fat/CD36 expression in the jejunum of the adult rat offspring. *Life Sci.* **2021**, *265*, 118765. [[CrossRef](#)]
 57. Hecht, F.B.; Teixeira, C.J.; de Souza, D.N.; Mesquita, F.P.N.; Roso, R.E.D.V.; Sodré, F.S.; Veronesi, V.B.; da Rocha, D.F.; Menezes, Y.G.D.; Pioli, M.R.; et al. Antenatal corticosteroid therapy modulates hepatic AMPK phosphorylation and maternal lipid metabolism in early lactating rats. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *144*, 112355. [[CrossRef](#)]
 58. Tobar, N.; Oliveira, A.G.; Guadagnini, D.; Bagarolli, R.A.; Rocha, G.Z.; Araújo, T.G.; Santos-Silva, J.C.; Zollner, R.L.; Boechat, L.H.; Carnevalheira, J.B.; et al. Diacerein improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice on a high-fat diet. *Endocrinology* **2011**, *152*, 4080–4093. [[CrossRef](#)]
 59. Veronesi, V.B.; Pioli, M.R.; de Souza, D.N.; Teixeira, C.J.; Murata, G.M.; Santos-Silva, J.C.; Hecht, F.B.; Vicente, J.M.; Bordin, S.; Anhê, G.F. Agomelatine reduces circulating triacylglycerides and hepatic steatosis in fructose-treated rats. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *141*, 111807. [[CrossRef](#)]
 60. Vicente, J.M.; Teixeira, C.J.; Santos-Silva, J.C.; de Souza, D.N.; Tobar, N.; Furtuoso, F.S.; Adabo, I.G.; Sodré, F.S.; Murata, G.; Bordin, S.; et al. The absence of lactation after pregnancy induces long-term lipid accumulation in maternal liver of mice. *Life Sci.* **2019**, *217*, 261–270. [[CrossRef](#)]
 61. Bialkowska, A.B.; Ghaleb, A.M.; Nandan, M.O.; Yang, V.W. Improved Swiss-rolling Technique for Intestinal Tissue Preparation for Immunohistochemical and Immunofluorescent Analyses. *J. Vis. Exp.* **2016**, *113*, e54161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 62. Illumina 16S metagenomic sequencing library preparation (Illumina Technical Note 15044223). Illumina. 2014.

Available online:
https://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html (accessed on 19 June 2018).

63. Caporaso, J.G.; Lauber, C.L.; Walters, W.A.; Berg-Lyons, D.; Huntley, J.; Fierer, N.; Owens, S.M.; Betley, J.; Fraser, L.; Bauer, M.; et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* **2012**, *6*, 1621–1624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Alishum, A. DADA2 formatted 16S rRNA gene sequences for both bacteria & archaea. *Res. Data* **2019**. [[CrossRef](#)]
65. Dhariwal, A.; Chong, J.; Habib, S.; King, I.L.; Agellon, L.B.; Xia, J. MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W180–W188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Chong, J.; Liu, P.; Zhou, G.; Xia, J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 799–821. [[CrossRef](#)]

7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento prolongado com IBP induz alterações claras na microbiota intestinal e na barreira intestinal, associadas ao aumento nos níveis circulantes de LPS e na sinalização inflamatória no fígado acompanhado também por um aumento da esteatose microvesicular hepática e fibrose.

Nossos dados estão de acordo com Takashima et al., que demonstraram que os IBPs aumentam a permeabilidade intestinal, associada a alterações na composição da microbiota. No entanto, em nosso estudo, fomos além e investigamos as implicações dessas alterações na permeabilidade intestinal e na disbiose na lesão hepática.

Dados anteriores mostraram que, em condições normais, o ácido gástrico atua como uma espécie de barreira, prejudicando a progressão para o trato GI inferior de bactérias não bem adaptadas ao baixo pH. Em alguns estudos, a composição da microbiota nas fezes também foi investigada e, embora não uniformemente observada, a maioria dos estudos mostrou que o uso crônico de IBPs modula a diversidade da microbiota e a abundância de comensais no cólon.

Nossos resultados demonstram um aumento da alpha diversidade na microbiota de camundongos tratados com IBP, confirmando a principal ação dos IBPs, de supressão de ácido gástrico. As mudanças na microbiota induzidas pelo pantoprazol aconteceram a nível do filo com aumento na abundância de Firmicutes e Proteobacteria, redução nos Bacteroidetes e aumento significativo na relação Firmicutes/Bacteroidetes, que tem a alteração do filo Proteobacteria foi marcada pelo aumento de bactérias do gênero *Bilophila* e *Helicobacter*. O gênero *Bilophila* já foi relacionado à perda da função da barreira intestinal, inflamação, alteração no metabolismo da glicose e esteatose hepática. As alterações na microbiota foram acompanhadas por aumento nos níveis circulantes de LPS. Firmicutes e Proteobacteria são dois filos principais que possuem LPS na membrana plasmática e esses dois filos foram aumentados em camundongos tratados com IBPs.

Embora o LPS tenha um papel no desenvolvimento da resistência à insulina (RI), essa resistência hormonal tem mecanismos mais complexos, que não se

limitam a modulações da microbiota, e mesmo que o pantoprazol tenha induzido alterações marcantes na microbiota e nos níveis de LPS tanto no sangue coletado da veia porta como no sangue coletado na veia cava, não observamos resistência sistêmica à insulina. Por outro lado, houve melhora da sensibilidade à insulina associada à redução da glicemia de jejum. Essa melhora na sensibilidade à insulina e no metabolismo da glicose também foi descrita em pacientes diabéticos tipo 2 em uso de IBP.

Embora não tenhamos investigado o mecanismo molecular para essa melhora na sensibilidade à insulina, dados anteriores de Peng, C.C et al, demonstraram que o aumento nos níveis de gastrina induzido por IBPs possivelmente atua como um mimético de incretina, melhorando a secreção de insulina e o metabolismo da glicose.

Os IBPs induzem ainda uma clara alteração na barreira epitelial intestinal, caracterizada por diminuição das proteínas de junção, associada também a diminuição das proteínas aderentes. A diminuição das proteínas de junções, como a ocludina, pode ser consequência da redução da síntese. Entretanto, a redução da proteína ZO-1 certamente independe do mRNA, que estava aumentado, provavelmente tentando compensar a redução nos níveis teciduais da proteína. Houve ainda, diminuição do mRNA da aquaporina 3 e do receptor de GLP2, que também são importantes para a integridade da barreira intestinal.

De acordo, com os resultados também houve aumento dos marcadores de fibrose hepática, conforme demonstrado no aumento de LPS e TGF β . Estudos anteriores mostraram que a disbiose no intestino pode influenciar a fibrose hepática através da translocação de bactérias e/ou seus produtos através da barreira intestinal. Nesse sentido, o aumento dos níveis circulantes de LPS na veia porta provavelmente contribuiu para o surgimento fibrose.

As alterações na barreira intestinal têm consequências no armazenamento de lipídios hepáticos e na inflamação. Nossos dados mostraram que o uso de IBPs por 60 dias pode aumentar discretamente o acúmulo de TG no fígado e também os valores séricos de ALT. Esteatose microvesicular induzida por PPI, que pode ser uma forma mais grave de esteatose (55). Em concordância, houve também aumento de marcadores de fibrose hepática.

Dados anteriores mostraram que a disbiose no intestino pode influenciar a fibrose hepática (56,57) através da translocação de bactérias e/ou seus produtos através da barreira intestinal. Nesse sentido, o aumento dos níveis circulantes de LPS na veia porta provavelmente contribuiu para o aumento da fibrose. O LPS liga-se ao TLR4 no fígado e induz vias de sinalização caracterizadas por um aumento na ativação de IKK β /NF κ B (58) e JNK. Nossos dados mostrando um aumento na fosforilação dessas duas serina quinases indicam um aumento na sinalização de LPS no fígado de camundongos tratados com IBP. Dados anteriores mostraram que o bloqueio da sinalização TLR4 ou o uso de antibióticos que reduzem a microbiota melhora a fibrose hepática experimental (59). É importante mencionar que a sinalização de TLR4 para o núcleo usa NF κ B através de IKK β , AP-1 através de JNK e IRF3 diretamente, e essas três vias foram ativadas no fígado de camundongos tratados com IBP (58).

O TLR4 é expresso em diferentes células do fígado, incluindo hepatócitos, células estreladas hepáticas (HSCs) e células de Kupffer. Nas HSCs, o TLR4 pode ativar um fenótipo fibrogênico, produzindo quimiocinas e moléculas de adesão que recrutam células de Kupffer (59). As células de Kupffer aumentam a produção de TGF β , que ativar a fibrogênese. Nossos dados mostram que esse mecanismo provavelmente está operando no fígado de camundongos tratados com pantoprazol porque, além da ativação da sinalização de TLR4 a jusante, também observamos um aumento nos níveis teciduais de TGF β nesses camundongos.

Diferente de nossos dados, um relato anterior de Lu et al. mostraram que o pantoprazol melhorou a fibrose hepática e suprimiu a ativação das células estreladas hepáticas em camundongos. Além disso, eles também mostraram em células que os PPIs podem regular negativamente a expressão de genes fibrogênicos hepáticos via YAP (proteína associada a Yes). No entanto, é importante mencionar que existem claras diferenças metodológicas entre nossos dados e este estudo que podem explicar a discrepância nos resultados. Primeiro, em seu estudo, Lu et al. usaram IBPs por quatorze dias em camundongos, o que provavelmente não é suficiente para induzir alterações na microbiota intestinal e/ou na permeabilidade intestinal. O modelo de lesão hepática que eles usaram é completamente diferente do nosso, e alguns de seus resultados são obtidos em cultura de células.

Em experimentos preliminares, utilizamos o mesmo modelo animal, onde estes receberam a mesma dose de pantoprazol descrita neste estudo, sendo 150 mg/kg em bebedouro e 75 mg/kg através de gavagem em dias alternados (segundas, quartas e sextas feiras) porém o período de tratamento foi de 30 dias. Neste estudo o uso de IBPs neste período não foi capaz de alterar a microbiota ou a permeabilidade intestinal, conforme demonstrado em dados anexados para as análises alfa e beta da microbiota e coloração de azul alcian para visualização das mucinas no íleo. Isso explica por que usamos IBP por 60 dias. A esse respeito, podemos sugerir que, embora os IBPs por curtos períodos ou in vitro possam ter efeitos protetores sobre a fibrose hepática, o uso prolongado de IBPs pode induzir disbiose, alterar a permeabilidade intestinal e induzir esteatose e fibrose hepáticas.

Nossos dados demonstraram que o uso prolongado de IBPs pode alterar a microbiota e a permeabilidade intestinal e contribuir para induzir a esteatose microvesicular e a fibrose são importantes como um modelo inicial para o estudo dessas interações in vivo. No entanto, é importante que estudos futuros também investiguem os efeitos de IBPs de longo prazo em modelos animais de azia ou DRGE.

Nosso estudo possui algumas limitações. Primeiro, um desenho cruzado não foi realizado porque o tempo para a microbiota se recuperar após o tratamento com IBP ainda é desconhecido. Em segundo lugar não utilizamos dose-resposta para IBPs neste estudo pois nosso objetivo era investigar o efeito de altas doses de IBPs. Como proposta para estudos futuros, sugerimos a investigação também dos efeitos dos IBPs de longo prazo em modelos de azia e DRGE.

Em resumo, nossos dados mostraram que o tratamento crônico com pantoprazol induziu a modulação da microbiota que não foi associada à RI. No entanto, a alteração da permeabilidade intestinal, associada ao aumento dos níveis circulantes de LPS, sinalização downstream de TLR4 e TGF β , pode ter um papel importante no aumento da esteatose microvesicular e fibrose. Finalmente, este modelo de alterações induzidas por IBP na microbiota pode ser útil para investigar a esteatose e fibrose microvesicular hepática.

8. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados possibilitam as seguintes conclusões relacionadas ao uso crônico do IBP pantoprazol:

- Induz disbiose intestinal acompanhada de alteração na barreira intestinal, mensurada pela medida do LPS na circulação sanguínea e redução das proteínas de junção e aderência epitelial, com manutenção da sensibilidade a insulina.
- Induz esteatose hepática microvesicular com fibrose.

Sendo assim, o presente estudo confirmou a hipótese inicial, ou seja, o uso crônico do IBP induz disbiose intestinal e desenvolvimento da DHGNA. No entanto, uma limitação do nosso estudo é que ainda não foi possível confirmar se a disbiose é previa à DHGNA ou simultânea.

9. REFERÊNCIAS

1. Hendrik Vilstrup¹ , Piero Amodio, Jasmohan Bajaj, Juan Cordoba, Peter Ferenci, Kevin D Mullen, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. 2014
2. David E Kleiner¹ , Elizabeth M Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa Contos, Oscar W Cummings, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 200.
3. Constance E Ruhl ¹, James E Everhart. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. Gastroenterology. 2003 Jan;124(1):71-9.
4. Giulio Marchesini ¹, Elisabetta Bugianesi, Gabriele Forlani, Fernanda Cerrelli , Marco Lenzi, Rita Manini, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology. 2003 Apr;37(4):917-23.
5. Kumiko Toshimitsu ¹, Bunzo Matsuura, Ikuko Ohkubo, Tetsuji Niiya, Shinya Furukawa, Yoichi Hiasa, Mieko Kawamura, et al. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. Nutrition 2007 Jan;23(1):46-52.
6. Dina G Tiniakos ¹, Miriam B Vos, Elizabeth M Brunt. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. Annu Rev Pathol 2010;5:145-71.
7. Parvez Hossain ¹, Bisher Kavar, Meguid El Nahas. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. N Engl J Med. 2007 Jan 18;356(3):213-5
8. Shiobhan R. Weston, Wendy Leyden, Rose Murphy, Nathan M. Bass, Beth P. Bell, M. Michele Manos, Norah A. Terrault. Racial and ethnic distribution of

nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Liver Failure and Liver Disease*. 19 January 2005

9. Marc-Andre Cornier¹, Dana Dabelea, Teri L Hernandez, Rachel C Lindstrom, Amy J Steig, Nicole R Stob, et al. The metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2008 Dec;29(7):777-822.

10. Jeffrey D Browning¹, Jay D Horton. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):147-52.

11. A Lonardo¹, P Loria, L E Adinolfi, N Carulli, G Ruggiero. Hepatitis C and steatosis: a reappraisal. *J Viral Hepat*. 2006 Feb;13(2):73-80.

12. Leon A Adams¹, James F Lymp, Jenny St Sauver, Schuyler O Sanderson, Keith D Lindor, Ariel Feldstein, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):113-21.

13. Zhiping Li¹, Mark J Soloski, Anna Mae Diehl. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Oct;42(4):880-5.

14. Guadalupe Sabio¹, Madhumita Das, Alfonso Mora, Zhiyou Zhang, John Y Jun, Hwi Jin Ko et al. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science*. 2008 Dec 5;322(5907):1539-43

15. María Eugenia Miquilena-Colina¹, Elena Lima-Cabello, Sonia Sánchez Campos, María Victoria García-Mediavilla, Miguel Fernández-Bermejo, Tamara Lozano-Rodríguez, Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*. 2011 Oct;60(10):1394-402.

16. Zhiping Li¹, Mark J Soloski, Anna Mae Diehl. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Oct;42(4):880-5.

17. Jennifer LeCouter¹, Dirk R Moritz, Bing Li, Gail Lewis Phillips, Xiao Huan

Liang, Hans-Peter Gerber, Kenneth J Hillan et al, Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*. 2003 Feb 7;299(5608):890-3.

18. Takashi Kadowaki¹, Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, Kazuo Hara Uaki, Kazuyuki Tobe. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1784-92.

19. Aimin Xu¹, Yu Wang, Hussila Keshaw, Lance Yi Xu, Karen S L Lam, The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003 Jul;112(1):91-100.

20. María-Angeles Aller¹, Jorge-Luis Arias, Jose García-Domínguez, Jose-Ignacio Arias, Manuel Durán, Jaime Arias. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008 Nov 3;1(1):6

21. Jason M Hui¹, Alex Hodge, Geoffrey C Farrell, James G Kench, Adamandia Kriketos, Jacob George. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?. *Hepatology*. 2004 Jul;40(1):46-54

22. Mark S. Beasley, Joseph V. Carcello, Dana R. Hermanson and Terry L. Neal. The Audit Committee Oversight Process. Contemporary Accounting Research, 2009, vol. 26, issue 1, 65-122

23. Inna Sekirov¹, Shannon L Russell, L Caetano M Antunes, B Brett Finlay. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jul;90(3):859-904.

24. A Suau¹, R Bonnet, M Sutren, J J Godon, G R Gibson, M D Collins, J Doré. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Nov;65(11):4799-807.

25. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915–1920

26. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial

mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915–1920.

27. L V Hooper ¹, M H Wong, A Thelin, L Hansson, P G Falk, J I Gordon. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001 Feb 2;291(5505):881-4.

28. Scarpellini, Emidio. Gut microbiota and obesity. *Intern Emerg Med*. 2010 Oct;5 Suppl 1:S53-6. doi: 10.1007/s11739-010-0450-1.

29. Zeppa, D.S Mutual Interactions among exercise, sport supplements and microbiota. *Nutrients*. 2019 Dec 20;12(1):17. doi: 10.3390/nu12010017.

30. Michael Blaut ¹. Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2015 Aug;74(3):227-34.

31. Guadalupe Sabio ¹, Madhumita Das, Alfonso Mora, Zhiyou Zhang, John Y Jun, Hwi Jin Ko. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science*. 2008 Dec 5;322(5907):1539-43

32. María Eugenia Miquilena-Colina ¹, Elena Lima-Cabello, Sonia Sánchez Campos , María Victoria García-Mediavilla, Miguel Fernández-Bermejo, Tamara Lozano-Rodríguez. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*. 2011 Oct;60(10):1394-402

33. Zhiping Li ¹, Mark J Soloski, Anna Mae Diehl. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Oct;42(4):880-5.

34. Maria Carmen Collado ¹, Erika Isolauri, Kirsi Laitinen, Seppo Salminen. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr*. 2008 Oct;88(4):894-9.

35. Keita Endo ¹, Tomoko Aoki, Yuka Yoda, Ken-ichi Kimura, Chihiro Hama. Notch

signal organizes the *Drosophila* olfactory circuitry by diversifying the sensory neuronal lineages. *Nat Neurosci*. 2007 Feb;10(2):153-60.

36. Jennifer LeCouter¹, Dirk R Moritz, Bing Li, Gail Lewis Phillips, Xiao Huan Liang, Hans-Peter Gerber, Kenneth J Hillan, Napoleone Ferrara Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*. 2003 Feb 7;299(5608):890-3.

37. K Tomita¹, G Tamiya, S Ando, K Ohsumi, T Chiyo, A Mizutani. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut*. 2006 Mar;55(3):415-24.

38. Takashi Kadowaki¹, Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Kazuyuki Tobe. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1784-92.

39. Aimin Xu¹, Yu Wang, Hussila Keshaw, Lance Yi Xu, Karen S L Lam, Garth J S Cooper. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003 Jul;112(1):91-100.

40. David van der Poorten¹, Kerry-Lee Milner, Jason Hui, Alexander Hodge, Michael I Trenell, James G Kench et al, Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology*. 2008 Aug;48(2):449-57.

41. Fayyaz S. Sutterwala, Yasunori Ogura, Richard A. Flavell. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Society for Leukocyte Biology 2006 Annual Meeting*

42. E S Alnemri, D J Livingston, D W Nicholson, G Salvesen, N A Thornberry, W W Wong, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):171.

43. Masayuki Miura. Active participation of cell death in development and organismal homeostasis. *Development, Growth & Differentiation*

44. Timea Csak ¹, Michal Ganz, Justin Pespisa, Karen Kodys, AngelaDolganiuc, Gyongyi Szabo. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells.Hepatology. 2011 Jul;54(1):133-44.
45. Jesse R. Dixon, Siddarth Selvaraj, Feng Yue, Audrey Kim, Yan Li, Yin Shen.Topological domains in mammalian genomes identified by analysis ofchromatin interactions. Nature. 2012 Apr 11;485(7398):376-80.
46. Janice Jou ¹, Steve S Choi, Anna Mae Diehl. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease.Semin Liver Dis. 2008 Nov;28(4):370-9
47. Angela Shannon ¹, Naim Alkhouri, Christine Carter-Kent, Lidia Monti, Rita Devito, Rocio Lopez, Ariel E Feldstein, Valerio Nobili. Ultrasonographic quantitative estimation of hepatic steatosis in children With NAFLD. J Pediatr GastroenterolNutr. 2011 Aug;53(2):190-5.
48. D W Nicholson ¹, N A Thornberry. Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci. 1997 Aug;22(8):299-306.
49. Gunnar C Hansson. Mucins and the Microbiome. Annu Rev Biochem. 2020 June 20; 89: 769–793. doi:10.1146/annurev-biochem-011520-105053
50. Paola Paone, Patrice D Cani. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? Gut. 2020 Dec; 69(12): 2232-2243
51. Jean-Bernard Denault ¹, Guy S Salvesen. Caspases: keys in the ignition of cell death. Chem Rev. 2002 Dec;102(12):4489-500
52. Kelly M Boatright ¹, Guy S Salvesen. Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell Biol. 2003 Dec;15(6):725-31
53. Llorente, C.; Jepsen, P.; Inamine, T.; Wang, L.; Bluemel, S.; Wang, H.J.; Loomba, R.; Bajaj, J.S.; Schubert, M.L.; Sikaroodi, M.; et al. Gastric acid suppression

promotes alcoholic liver disease by inducing overgrowth of intestinal *Enterococcus*. *Nat. Commun.* 2017, 8, 837

54. Christian R H Raetz ¹, Chris Whitfield. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.

55. MCaroff^a et al, Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* Volume 4, Issue 9, July 2002, Pages 915-926

56. Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytocine.* 42: 145-151

57. Sharifnia, T.; Antoun, J.; Verriere, T.G.; Suarez, G.; Wattacheril, J.; Wilson, K.T.; Peek, R.M.; Abumrad, N.N.; Flynn, C.R. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2015, 309, G270–G278

58. Henderson, N.C.; Rieder, F.; Wynn, T.A. Fibrosis: From mechanisms to medicines. *Nature* 2020, 587, 555–566.

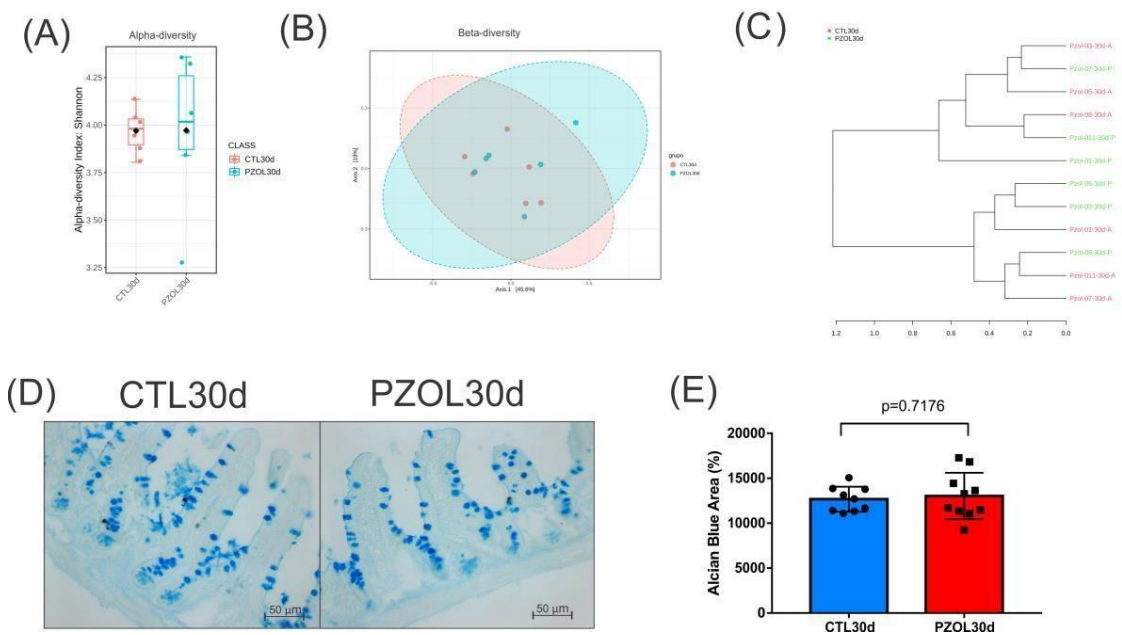
59. Paik, Y.H.; Schwabe, R.F.; Bataller, R.; Russo, M.P.; Jobin, C.; Brenner, D.A. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003, 37, 1043–1055.

60. Sharifnia, T.; Antoun, J.; Verriere, T.G.; Suarez, G.; Wattacheril, J.; Wilson, K.T.; Peek, R.M.; Abumrad, N.N.; Flynn, C.R. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2015, 309, G270–G278

61. Seki, E.; De Minicis, S.; Osterreicher, C.H.; Kluwe, J.; Osawa, Y.; Brenner, D.A.; Schwabe, R.F. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.* 2007, 13, 1324–1332

10. APÊNDICES

10.1 Análises do grupo tratado por 30 dias com pantoprazol.



11. ANEXOS

11.1 Comitê de Ética

CERTIFICADO CEUA nº 163/2021



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Efeito do inibidor de bomba de prótons Pantoprazol sobre a microbiota intestinal e a instalação de doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos**, registrada com o nº **5762-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad e Kelly Cristiane Gabriel de Almeida**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/05/2021**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2021 a 31/12/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/05/2021 a 31/12/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib (descrição CEMIB)
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib (descrição CEMIB)
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib (descrição CEMIB)
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib (descrição CEMIB)
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Unidade Multidisciplinar de Experimentação Animal - UMEA, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **05 de agosto de 2021**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 37E37CEA 9A20486F 82F19532 E5A23383

Documento assinado eletronicamente por **CÍNTIA BAÚ BETIM CAZARIN, VICE-COORDENADORA CEUA/UNICAMP**, em 05/08/2021, às 13:09 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 06/08/2021, às 08:20 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
37E37CEA 9A20486F 82F19532 E5A23383



11. 2 Autorização para uso do artigo

Assunto: Re: request permission ijms-1919687; doi: 10.3390/ijms232213766

Dear Dr. Saad,

Thank you very much for your kind mail. IJMS is a full open access journal. The copyright is retained by the authors.

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means: everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given. You can view more details via this link: <https://www.mdpi.com/openaccess>

Feel free to let us know if you have any other question.

Best,
Dani