

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde

LARISSA SALOMONI CARPES

**PERMEABILIDADE INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM
DOENÇA RENAL DO DIABETES**

Porto Alegre

2020

LARISSA SALOMONI CARPES

**PERMEABILIDADE INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM
DOENÇA RENAL DO DIABETES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Alimentação, Nutrição e Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Alimentação, Nutrição e Saúde.

Orientadora: Prof^a Dra. Gabriela Corrêa Souza.

Colaboradora: Prof^a. Dra. Daisy Crispim

Porto Alegre

2020

LARISSA SALOMONI CARPES

**PERMEABILIDADE INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM
DOENÇA RENAL DO DIABETES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Alimentação, Nutrição e Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Alimentação, Nutrição e Saúde.

Porto Alegre, 19 de fevereiro de 2020.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado **“Permeabilidade intestinal em indivíduos com Doença Renal do Diabetes”**, elaborado por LARISSA SALOMONI CARPES, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentação, Nutrição e Saúde.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Carolina Guerini Souza (UFRGS)

Profa. Dra. Andrea Carla Bauer (HCPA)

Profa. Dra. Bruna Bellincanta Nicoletto (UCS)

Profa. Dra. Gabriela Corrêa Souza – Orientadora (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Cecilia e à minha avó Alicia, por me oferecerem apoio em mais uma etapa da minha vida. Vocês são meu estímulo para correr atrás de oportunidades e me desafiar sempre. Sem vocês, isso não teria sido possível!

Ao meu noivo Daniel, pelo estímulo e pela ajuda para que eu supere os obstáculos, com muito amor e bom-humor, após 9 anos de relacionamento. Esta dissertação tem um pedaço, após a ajuda com análises laboratoriais que só um biólogo poderia realizar.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Nut. Gabriela Souza, que me orienta há 5 anos, com todo auxílio e apoio que me fizeram crescer como pessoa, aluna e profissional. Muito obrigada pelas oportunidades que me deste desde a graduação!

À minha colaboradora, Prof^a. Dr^a. Daisy Crispim, que me acolheu de maneira imediata e me ensinou diversas técnicas de bancada, além de todo o auxílio para realizar este trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, principalmente o grupo de estatística, como Vânia, Suzi e Rogério, pela paciência e esclarecimento de dúvidas.

À nova amizade que fiz nestes 2 anos de mestrado, Nut. Tamyris Sangali, nosso apoio, nossas semelhanças e nossa conexão me ajudaram a finalizar esta etapa!

Às minhas outras amigas mestrandas, Bruna, Jade e Vanessa, obrigada por todo o apoio de sempre!

Aos meus amigos, obrigada pelo apoio, que mesmo de longe, me ajudaram a todo instante.

RESUMO

Introdução: A permeabilidade intestinal é uma característica da barreira intestinal que realiza o controle de substâncias do meio externo para o meio interno do organismo. Estudos mostram sua associação com diversas doenças crônicas, como obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus (DM) e doença renal crônica (DRC). Diversos marcadores têm sido estudados para avaliar a permeabilidade intestinal em diferentes patologias entre eles, a zonulina, uma proteína responsável por realizar a abertura das junções firmes ou *tight junctions* (do inglês), encontradas entre os enterócitos da barreira intestinal.

Objetivos: Avaliar a permeabilidade intestinal, através da zonulina sérica, em indivíduos com doença renal do diabetes (DRD), e associá-los com parâmetros renais, glicêmicos, lipídicos, inflamatórios e antropométricos.

Metodologia: Este é um estudo caso-controle, que incluiu quatro grupos de indivíduos: 1) controle não-DM2: sem DM2 ou DRC; 2) controle DM2: pacientes diabéticos sem função renal prejudicada; 3) DRD albuminúricos: pacientes diabéticos com albuminúria (EUA) > 30 mg/g de creatinina, mas taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) > 60 ml/min/1,73 m³; 4) DRD avançada: pacientes diabéticos com EUA > 30 mg/g de creatinina e TFGe < 60 ml/min/1,73 m³. Permeabilidade intestinal foi determinada por níveis séricos de zonulina utilizando o teste de ELISA. Outros parâmetros clínicos foram avaliados, como glicemia em jejum, hemoglobina glicada, colesterol total, colesterol-LDL (LDL), colesterol-HDL, triglicerídeos, interleucina-6, proteína C-reativa, creatinina, albuminúria, proteinúria, gordura corporal e força do aperto de mão (FAM).

Resultados: Oitenta e seis pacientes foram incluídos no estudo (18 controles não-DM2, 26 controles DM2, 20 DRD albuminúricos e 22 DRD avançada). A maioria dos sujeitos era do sexo feminino e de etnia caucasiana. Os pacientes dos grupos com DM2 não apresentaram diferença na duração do diabetes. Além disso, a maioria dos pacientes diabéticos era hipertensa ($p < 0,001$), diferente do grupo não-DM2. Os pacientes do grupo controle DM2 apresentaram os maiores níveis de zonulina quando comparado ao grupo DRD avançada ([131,3 (83,0-170,5) vs. 63,7 (45,0-106,0) µg/mL; $p = 0,004$]). Após transformação logarítmica e ajustes para LDL, FAM e percentual de gordura corporal, ocorreram diferenças entre o grupo controle DM e os grupos

controle não-DM, DRD albuminúricos e DRD avançada ($p = 0,003$), demonstrando uma permeabilidade intestinal prejudicada nos pacientes controles DM. Houve uma correlação positiva entre zonulina sérica e colesterol total ($r = 0,29$; $p = 0,034$), LDL ($r = 0,26$; $p = 0,021$), TFGe ($r = 0,22$; $p = 0,040$) e FAM ($r = 0,28$; $p = 0,011$) e, correlações negativas entre zonulina e duração do DM ($r = -0,24$; $p = 0,049$), percentual de gordura corporal ($r = -0,27$; $p = 0,014$), proteinúria ($r = -0,21$; $p = 0,048$), albuminúria ($r = -0,24$; $p = 0,024$) foram observadas. Não houve correlações significativas entre zonulina e parâmetros inflamatórios. Menores concentrações de zonulina foram encontradas em pacientes que apresentaram desfechos renais, como perda de função renal ou hemodiálise após 5 anos da inclusão no estudo ($p = 0,007$).

Conclusão: Os valores séricos elevados de zonulina sugerem que os pacientes do grupo controle DM2 apresentam uma permeabilidade intestinal prejudicada, quando comparado aos controles saudáveis. Ao avaliar diversos grupos de pacientes diabéticos com funções renais distintas, é possível observar que menores níveis de zonulina parecem apresentar piores desfechos renais.

Palavras-chave: permeabilidade intestinal; zonulina; doença renal do diabetes; diabetes mellitus; doença renal crônica.

ABSTRACT

Introduction: Intestinal permeability is a gut barrier feature that controls the flux between external and internal environment. Studies show its association with chronic diseases, such as obesity, cardiovascular diseases, diabetes mellitus (DM) and chronic kidney disease (CKD). Some markers have been studied to measure intestinal permeability in illness, among them, zonulin, which is a protein responsible for opening tight junctions found between the gut barrier.

Objectives: Evaluate intestinal permeability by measuring serum zonulin in subjects with diabetic kidney disease (DKD), and correlate it with renal, glycemic, lipid, inflammatory and anthropometric parameters.

Methods: This is a case-control study which included four groups of subjects: 1) non-DM controls: without DM2 and without CKD; 2) DM controls: diabetic patients without impaired renal function; 3) Albuminuric DKD: diabetic patients with albuminuria (UAE) > 30 mg/g creatinin, but estimated Glomerular Function Rate (eGFR) > 60 ml/min/1,73 m²; 4) Advanced DKD cases: diabetic patients with albuminuria (UAE) > 30 mg/g creatinin and eGFR < 60 ml/min/1,73 m². Intestinal permeability was estimated by serum zonulin levels by ELISA. Other clinical parameters were evaluated, such as fasting glucose, glycated hemoglobin, total cholesterol, LDL-cholesterol (LDL), HDL-cholesterol, triglycerides, interleukin-6, high sensitivity C-reactive protein, creatinine, albuminuria, proteinuria, body fat and handgrip strength (HGS).

Results: Eighty-six patients were included in the study (18 non-DM control, 26 DM control, 20 albuminuric DKD, 22 advanced DKD). Most subjects were female and Caucasian. Diabetic patients had similar diabetes duration. In addition, most diabetic patient were hypertensive ($P < 0,001$), unlike the non-DM subjects. Serum zonulin was increased in control DM patients when compared to advanced DKD cases [131,3 (83,0-170,5) vs. 63,7 (45,0-106,0) $\mu\text{g/mL}$; $P = 0,004$]. After logarithmic transformation and adjustments for LDL, HGS and body fat, control DM group showed higher zonulin levels showing statistical difference between control DM group compared to non-DM control, albuminuric and advanced DKD ($P = 0,003$), indicating an impaired intestinal permeability in control DM subjects. There was a positive correlation between serum zonulin and total cholesterol ($r = 0,29$; $P = 0,034$), LDL ($r = 0,26$; $P = 0,021$), eGFR ($r = 0,22$; $P = 0,040$) e HGS ($r = 0,28$; $P = 0,011$) and, negative correlation between zonulin and DM duration ($r = -0,24$; $P = 0,049$), body fat ($r = -0,27$; $P = 0,014$), proteinuria ($r =$

-0,21; P = 0,048) and albuminuria (r = -0,24; P = 0,024) were observed. No correlation between zonulin and inflammatory parameters was found. Lowest zonulin levels were found in patients who presented renal function loss or started hemodialysis after 5 years of study inclusion (P = 0,007).

Conclusion: Elevated serum zonulin levels suggests DM control group have an impaired intestinal permeability compared to non-DM controls. After evaluating different renal functions in diverse diabetic patients, we could observe that decreased zonulin levels seems to be related to worse renal outcomes.

Key-words: intestinal permeability; zonulin; diabetic kidney disease; diabetes mellitus; chronic kidney disease.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul:

1. Revisão da literatura
2. Artigo original

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente Vascular Cerebral
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease – Epidemiology Colaboration
⁵¹Cr-EDTA	⁵¹ Cr-ácido etilenodiaminotetracético
CT	Colesterol total
DM	Diabetes mellitus
DRC	Doença Renal Crônica
DRD	Doença Renal do Diabetes
ESRD	<i>End stage renal disease</i>
EUA	Excreção urinária de albumina
FAM	Força do aperto de mão
GLP-1	Peptídeo 1 semelhante ao glucagon
HDL	Colesterol-HDL
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IgA	Imunoglobulina A
IL-6	Interleucina-6
KDIGO	<i>Kidney Disease – Improving Global Outcomes</i>
LDL	Colesterol-LDL
LPS	Lipopolissacarídeo
PCRus	Proteína C-reativa ultrassensível
PEG	Polietileno glicol
SCFA	<i>Short chain fatty acids</i>
TFGe	Taxa de Filtração Glomerular estimada
TG	Triglicerídeos

TGI	Trato gastrointestinal
TMA	Trimetilamina
TMAO	N-óxido trimetrlamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Relação entre permeabilidade intestinal, microbiota intestinal e imunidade da mucosa	17
Figura 2	Conceito hipotético sobre como o rim em estágio terminal e a microbiota intestinal afetam uma à outra	22
Figura 3	Relação bidirecional entre a microbiota intestinal e progressão da DRC	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 <i>Microbiota intestinal</i>	14
2.2 <i>Permeabilidade intestinal</i>	16
2.3 <i>Permeabilidade intestinal em doenças crônicas</i>	18
2.4 <i>Doença Renal do Diabetes e permeabilidade intestinal</i>	20
3 OBJETIVOS	26
REFERÊNCIAS	27
4 ARTIGO ORIGINAL	36
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62

1. INTRODUÇÃO

O intestino é um órgão que constitui o trato gastrointestinal, dividido em dois segmentos: delgado e grosso. Como principais funções, ele realiza a digestão e absorção de nutrientes, água e eletrólitos vindos da dieta, produção de enzimas e muco, e por fim a formação de fezes (KONG; ZHANG; ZHANG, 2018). Seu efeito não é apenas local, o intestino possui complexos componentes que estão associados com outras vias metabólicas (TANG; KITAI; HAZEN, 2017).

A barreira intestinal é uma fina camada de células epiteliais que facilitam a absorção, mas também serve como prevenção física da entrada de moléculas grandes como enzimas digestivas, toxinas e bactérias para a circulação (VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017). O acesso dessas substâncias é controlado por uma característica da barreira definida como permeabilidade intestinal (BISCHOFF et al., 2014). Entre as células epiteliais existem proteínas que separam ou juntam os enterócitos, conforme o estímulo. Elas são conhecidas como *tight junctions* (junções apertadas) e são essenciais para manter a homeostase intestinal (ULLUWISHEWA et al., 2011).

Quando há dano ou defeito da mucosa intestinal pode ocorrer o aumento da entrada de antígenos ou microrganismos. Esse fluxo incontrolado pode ser o gatilho para o início de mecanismos inflamatórios no intestino e em outros órgãos (VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017). A permeabilidade intestinal prejudicada pode estar associada com diversas patologias, como doenças gastrointestinais, cerebrais, autoimunes e metabólicas (BISCHOFF et al., 2014). Estudos têm demonstrado que pacientes com obesidade, diabetes mellitus e doença renal parecem ter um maior número de bactérias produtoras de toxinas, influenciadas pelo seu consumo alimentar, como redução na ingestão de fibras, uso de antibiótico e estilo de vida (TANG; KITAI; HAZEN, 2017; XING; PETTERSSON; KUNDU, 2020).

O estudo pioneiro em que avaliou a permeabilidade intestinal iniciou no século XVII, através da introdução de leite com corante azul no intestino de cachorros (LISTER, 1673), demonstrando indícios de que ocorre um fluxo de substâncias através da barreira intestinal. No início do século XX, foi possível observar que a barreira intestinal não é impermeável, mas sim dinâmica (HOBBER, 1901; OSTERHOUT, 1912). Entre as décadas de 1920 e 1930, iniciaram-se os testes com diferentes tipos de açúcares em modelos animais, sugerindo a seletividade de

absorção no intestino (HEWETT, 1924; MCCANCE; MADDERS, 1930; HOBBER; HOBBER, 1937). Já no início dos anos 1960, a importância da via paracelular (USSING; WINDHAGER, 1964) foi definida a partir da descoberta das *tight junctions* (FARQUHAR; PALADE, 1963), impulsionando a pesquisa em humanos. Assim, foi utilizado o polietileno glicol (PEG), um marcador não absorvível que sugeriu a presença de poros hidrofílicos no enterócitos (FORDTRAM et al., 1965). Logo, iniciou-se a procura por métodos menos invasivos (GRYBOSKI et al., 1963). Então, na década de 1970, testes utilizando açúcares com pesos moleculares diferentes foram realizados em pacientes celíacos (WHEELER et al., 1978), introduzindo a combinação de dissacarídeos e monossacarídeos (COBDEN et al., 1978). Estes estudos demonstraram que pacientes com doença celíaca apresentam dissacaridúria, ou seja, maior permeabilidade intestinal. Entre as décadas de 1970 e 1980, os testes utilizando PEG (CHADWICK et al., 1977) e ^{51}Cr -EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (BJARNASON et al., 1983) pareciam ser mais indicados, tendo em vista que não são degradados pelas bactérias intestinais, diferente dos carboidratos. Por fim, outros testes podem ser considerados para quantificar o dano da permeabilidade intestinal, como as proteínas responsáveis por manter a barreira intestinal intacta, como a ocludina, claudina e zonulina, ou por substâncias produzidas pelas bactérias, como o lipopolissacarídeo (LPS) (BISCHOFF et al., 2014). Uma revisão sistemática demonstrou que, nos estudos incluídos na análise, a zonulina, teste duplo de açúcar e LPS apresentaram boa correlação entre eles para avaliar a permeabilidade intestinal (LEECH et al., 2019).

Os estudos que avaliam a zonulina sérica como marcador de permeabilidade intestinal nas doenças metabólicas têm aumentado durante os anos. Os pesquisadores referem que ocorre um aumento nos níveis de zonulina em pacientes diabéticos, mostrando uma barreira intestinal mais permeável (HASSLACHER et al., 2018). Já pacientes com DRC em estágio pré-diálise ou pós-transplante renal apresentam menores níveis séricos de zonulina quando comparado aos indivíduos saudáveis (LUKASZYK et al., 2017; MALYSZKO et al., 2014). Seu efeito na função renal, porém, não foi totalmente elucidado. Por isso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a permeabilidade intestinal através da zonulina sérica em pacientes com Doença Renal do Diabetes e compará-los com pacientes diabéticos em diferentes estágios da doença renal e indivíduos saudáveis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é um órgão colonizado por microrganismos que coexistem de forma simbiótica com o hospedeiro, sendo definido como microbiota intestinal. A microbiota é constituída por 10 a 100 trilhões de seres, como bactérias, fungos e vírus (SENDER; FUCHS; MILO, 2016), sendo sua maioria bactérias. Em torno de 90% delas são representadas por apenas 4 filos: *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. A maioria das bactérias benéficas são as *Firmicutes* e *Citophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (BIBBÒ et al., 2016).

A composição da microbiota inicia, primeiramente, na placenta. Após o parto, fatores como o aleitamento materno, introdução alimentar, higiene e uso de medicamentos condicionam a formação da microbiota (TOJO et al., 2014). Além disso, ela é variável entre as populações, de acordo com a genética, etapa de vida, ambiente e dieta. Atualmente, a microbiota tem sido considerada como um órgão endócrino (BUSNELLI; MANZINI; CHIESA, 2020). Como principais funções no corpo humano, ela realiza a produção de vitaminas e nutrientes essenciais, proteção contra patógenos, regulação do sistema imune, além de atuar no metabolismo dos ácidos biliares e auxiliar na digestão de nutrientes vindos da dieta (ARON-WISNEWSKY; CLÉMENT, 2016).

Alterações na composição da microbiota e na produção de seus metabólitos podem ser vistas de acordo com os fatores desencadeantes. A disponibilidade de nutrientes ingerida tem forte influência na microbiota (BROWN et al., 2012). Um consumo adequado de oligossacarídeos e carboidratos complexos, principalmente fibras, favorece o crescimento de bactérias sacarolíticas (*Bifidobacteria spp.* e *Lactobacillus spp.*) e produção de energia para a fermentação, e o consumo proteico auxilia no seu crescimento (EVENEPOEL et al., 2009). O processo de fermentação bacteriana produz ácidos graxos de cadeia curta (SCFA – *short-chain fatty acids*), como butirato, acetato e propionato, que novamente são utilizados como fonte de energia pelos colonócitos e outras bactérias (ANDERS; ANDERSEN; STECHER, 2013) e contribui na saciedade e homeostase da glicose (CANI; DELZENNE, 2009). Além disso, os SCFA reduzem o pH intestinal, prevenindo o crescimento de bactérias

potencialmente patogênicas, como *Escherichia coli* e *Enterobacteriaceae* (BIBBÒ et al., 2016).

Quando há desequilíbrio entre bactérias benéficas e maléficas, define-se como disbiose intestinal. Além do uso de antibióticos e anti-inflamatórios não-esteroidais e tabagismo, outro importante fator associado é o padrão dietético ocidental (elevado consumo de gordura saturada e proteína animal), que está relacionado com aumento de *Bacteroides* e *Enterobacteriaceae* (WU et al., 2011). Estas bactérias, que são gram-negativas, possuem um componente estrutural de parede de fosfolipídios, onde fragmentos são liberados no intestino, acarretando no aumento de LPS, considerados endotoxinas (BROWN; SADARANGANI; FINLAY, 2013). Estudos demonstraram que o aumento de LPS está associado com doenças crônicas, como obesidade e diabetes mellitus (DM) (TRØSEID et al., 2013). Além disso, ocorre a formação paralela de outros metabólitos, como a amônia, aminas, tióis, fenóis e indol, excretados pelas fezes e rins (EVENEPOEL et al., 2009; SABATINO et al., 2015; TANG; KITAI; HAZEN, 2017).

Alguns destes metabólitos, como a trimetilamina (TMA) e os SCFA, apresentam efeitos importantes em algumas vias metabólicas. Após a transformação hepática de TMA em N-óxido trimetilamina (TMAO), seu efeito deletério nas células endoteliais pode exacerbar o desenvolvimento de aterosclerose (BUSNELLI; MANZINI; CHIESA, 2020; KOETH, 2013). Ainda, indoxil sulfato e p-cresil sulfato parecem ser marcadores precoces de redução de função renal (BARRIOS et al., 2015), pois tem efeito no aumento da fibrose renal. Por fim, a produção excessiva de amônia e ureia causam injúria das células epiteliais.

Já a produção de SCFA parece contribuir na prevenção de obesidade e hipertensão, além de apresentar efeito importante na modulação da permeabilidade de células intestinais, promovendo a integridade da barreira intestinal (PENG et al., 2009). A permeabilidade intestinal parece ter um papel na fisiopatologia de diversas doenças crônicas. Essa é uma característica importante do epitélio intestinal e que tem ganhado relevância clínica.

2.2. Permeabilidade intestinal

O intestino é um órgão com uma camada única de células epiteliais que funcionam como uma barreira física entre o ambiente externo e a circulação sanguínea (OLIVEIRA; HAMMES, 2016; STURGEON; FASANO, 2016). A barreira intestinal previne contra a perda de eletrólitos e água, além de impossibilitar a entrada de antígenos e microrganismos para dentro do corpo. Ainda, ela permite a troca de moléculas entre hospedeiro e ambiente, e realiza a absorção de nutrientes (BISCHOFF et al., 2014). Esse controle de entrada de substâncias para dentro da célula é chamado de permeabilidade intestinal. Uma permeabilidade intestinal normal é definida como “uma permeabilidade estável encontrada em indivíduos saudáveis, sem sinais de inflamação, intoxicação ou função intestinal prejudicada” (BISCHOFF et al., 2014).

Sabe-se que bactérias comensais têm efeito na permeabilidade intestinal (STURGEON; FASANO, 2016). A **Figura 1** demonstra a relação entre microbiota intestinal, imunidade da mucosa e permeabilidade intestinal. Existem mecanismos de defesa e regulação da barreira intestinal que modulam a entrada de substâncias. As membranas dos enterócitos, a secreção de muco e o mecanismo de defesa imunológico são alguns exemplos (SEKIROV et al., 2010). As proteínas chamadas de *tight junctions* mantêm a permeabilidade intestinal conforme as necessidades fisiológicas. Elas possuem proteínas aderentes, conhecidas como ocludina, claudina e zonulina (BAUMGART; DIGNASS, 2002).

Figura 1: Relação entre permeabilidade intestinal, microbiota intestinal e imunidade da mucosa.



Fonte: Bischoff et al., 2014.

O importante papel fisiológico da permeabilidade intestinal tem sido observado tanto em aspectos fisiológicos quanto patológicos. Por isso, cada vez mais estudos estão descrevendo métodos de avaliação da permeabilidade intestinal em indivíduos, mas os resultados são controversos. Inicialmente, eram utilizados métodos mais invasivos, como biópsia de tecido intestinal através da Câmara de Ussing (USSING; ZERAHN, 1951). Atualmente, dispomos de alguns marcadores não-invasivos, que podem ser orais, séricos, urinários e fecais. O método mais comum é o teste duplo de açúcar, que consiste na administração oral de dois componentes com composição molecular e absorção diferentes, com posterior medição urinária e expressa na razão lactulose/manitol (BJARNASON; MACPHERSON; HOLLANDER, 1995).

Além disso, é possível dosar alguns marcadores relacionados às bactérias, como as endotoxinas (LPS) ou de dano epitelial (*tight junctions*), após coleta de amostras séricas, urinárias ou fecais. Uma revisão sistemática demonstrou o uso oral de lactulose/manitol, zonulina sérica ou fecal e LPS sérico para avaliar a permeabilidade em diversas patologias (LEECH et al., 2019). Ao avaliarem os artigos incluídos na revisão, os autores relatam que a zonulina sérica apresentou alta correlação com outros dois marcadores de permeabilidade intestinal, o teste duplo de açúcar (lactulose/manitol) e com o LPS, podendo assim ser considerado um marcador de alta acurácia para avaliar a permeabilidade intestinal em pacientes com diferentes

patologias (LEECH et al., 2019). Como o teste duplo de açúcar demanda mais tempo do paciente (em torno de 5-8h), o uso de outros marcadores pode ser mais vantajoso do ponto de vista logístico (BISCHOFF et al., 2014).

Em 2000, o pesquisador Fasano descobriu uma toxina que realizava a abertura do espaço entre os enterócitos, chamada de *Zonula occludens toxin*, após a produção da vacina de cólera (FASANO et al., 2000). Anos depois, foi possível encontrar uma proteína produzida pelo corpo que realiza a mesma função que a toxina, chamada então de zonulina (FASANO, 2011). Ela foi descrita como uma proteína de aproximadamente 47 dKa, que regula a permeabilidade intestinal de forma reversível. A zonulina faz parte das *tight junctions*, responsável por regular a passagem de moléculas entre o lúmen intestinal e a corrente sanguínea, pela rota paracelular. Sua liberação no lúmen acarreta em aumento de permeabilidade intestinal e desmontagem da zonulina do complexo das *tight junctions*. Seu estímulo se dá, principalmente, pela presença de bactérias e a proteína do glúten, gliadina (STURGEON; FASANO, 2016). Ela foi primeiramente observada em pacientes com doença celíaca (FASANO et al., 2000).

2.3. Permeabilidade intestinal em doenças crônicas

Inicialmente, os estudos evidenciavam que a microbiota estava associada com doenças locais, que acometiam apenas o TGI, como doença inflamatória intestinal, gastrite ou úlcera péptica (FLOCH; RINGEL; WALKER, 2016). Entretanto na última década, os estudos referem que uma microbiota desequilibrada torna o intestino mais permeável (TANG; KITAI; HAZEN, 2017). Sendo assim, uma permeabilidade intestinal prejudicada tem como característica a perda da homeostase intestinal, comprometimento funcional e doenças que podem afetar outras regiões do organismo (BISCHOFF et al., 2014).

O principal acometimento intestinal é a entrada de substâncias que deveriam ser excretadas nas fezes. A entrada de bactérias, DNA bacteriano e outros metabólitos provenientes do metabolismo bacteriano para dentro da célula e posterior circulação é chamado de translocação bacteriana (BAUMGART; DIGNASS, 2002). Como defesa, o corpo realiza a ativação de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T (VAZIRI et al., 2012). Essa cascata ocasiona em inflamação local e

sistêmica (ADELVANE; RODRIGUES, 2016), e está relacionada com doenças crônicas sistêmicas ou “extraintestinais” e inflamação sistêmica de baixo grau (BISCHOFF et al., 2014).

O rompimento da barreira intestinal pode ter um papel no desenvolvimento de doenças, entretanto parece não ser suficiente para o desenvolvimento das mesmas. Tendo em vista que seu papel fisiopatológico não foi totalmente elucidado, sabe-se que a permeabilidade intestinal prejudicada inicia uma cascata inflamatória (STURGEON; FASANO, 2016). Uma revisão sistemática recente teve como objetivo identificar os fatores de risco mais associados com a permeabilidade intestinal. Inflamação, dislipidemia, hiperglicemia, obesidade, dieta ocidental, comorbidades e severidade de doenças graves parecem ser os fatores que mais influenciaram na permeabilidade intestinal (LEECH et al., 2019).

Os dados sobre marcadores que avaliam a permeabilidade intestinal nas doenças crônicas são escassos e controversos. O teste duplo de açúcar já foi associado com doenças hepática avançada e cirrose, mostrando uma permeabilidade intestinal prejudicada, com elevado perfil inflamatório nesses pacientes (CARIELLO et al., 2010). Já o LPS demonstrou permeabilidade prejudicada em pacientes com obesidade (TRØSEID et al., 2013), DM2 (JAYASHREE et al., 2014), inflamação por Interleucina-6 (IL-6) (MORENO-NAVARRETE et al., 2012) e doença renal crônica (DRC) (FICEK et al., 2017).

A zonulina também foi utilizada como um marcador de permeabilidade intestinal na dislipidemia (OHLSSON; ORHO-MELANDER; NILSSON, 2017), obesidade (MORENO-NAVARRETE et al., 2012) e no DM2. O aumento de zonulina sérica em pacientes DM2 demonstrou uma permeabilidade intestinal prejudicada, quando comparado aos indivíduos saudáveis (HASSLACHER et al., 2018). O mesmo foi encontrado em pacientes diabéticos em pré-diálise, com elevados níveis de LPS e TMAO (AL-OBAIDE et al., 2017). Estes resultados referem que elevados níveis de zonulina parece demonstrar uma permeabilidade intestinal prejudicada. Em contrapartida, dois estudos demonstraram valores reduzidos de zonulina sérica em pacientes com função renal prejudicada, quando comparado a indivíduos saudáveis, mostrando que o mecanismo da zonulina na função renal não foi totalmente compreendido (LUKASZYK et al., 2017; MALYSZKO et al., 2014). Esses dados corroboram com uma revisão sistemática que encontrou resultados contraditórios em

relação aos métodos de permeabilidade intestinal na DRC. Os autores concluem que a avaliação de D-lactato produzida pelas bactérias e quantificação bacteriana não são influenciadas pela função renal, porém é necessário cautela ao interpretar os resultados (TERPSTRA et al., 2016). Sendo assim, é possível observar que a avaliação da permeabilidade intestinal ainda é um cenário controverso.

2.4. Doença Renal do Diabetes e Permeabilidade intestinal

De acordo com a *International Diabetes Federation* (IDF, Federação Internacional de Diabetes), em 2017, a prevalência mundial de diabetes era de 8,8%, ou seja, 424,9 milhões de pessoas apresentavam algum tipo de diabetes mellitus. Estima-se que, no ano de 2045, ocorra um aumento para 628,6 milhões de casos. O Brasil encontra-se em 4º lugar entre os países com maior número de casos de diabetes no mundo, ficando atrás apenas da China, Índia e Estados Unidos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Já está bem estabelecido que a hiperglicemia é a causa mais importante de complicações vasculares em órgãos-alvo em pacientes diabéticos (ROCCO; BERNS, 2012). Cerca de 20 a 40% dos pacientes possuem algum acometimento renal, sendo denominado Doença Renal do Diabetes (DRD) (KDIGO, 2013). A prevalência de ESRD (*end stage renal disease* – doença renal em estágio final) ocorre 10 vezes mais em pacientes com diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Em pacientes com DM2, o rastreamento para avaliação de complicações em órgão-alvo deve ocorrer anualmente. O diagnóstico da DRD é clínico, baseado na presença de albuminúria (> 30 mg/g de creatinina) e/ou redução da Taxa de Filtração Glomerular estimada (eTFG) (eTFG < 60 ml/min/1,73m²), além da ausência de sinais ou sintomas de outras causas de dano renal. Também são incluídos aqueles pacientes que apresentam uma longa duração do DM, albuminúria sem hematúria e perda gradual e progressiva da eTFG (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019).

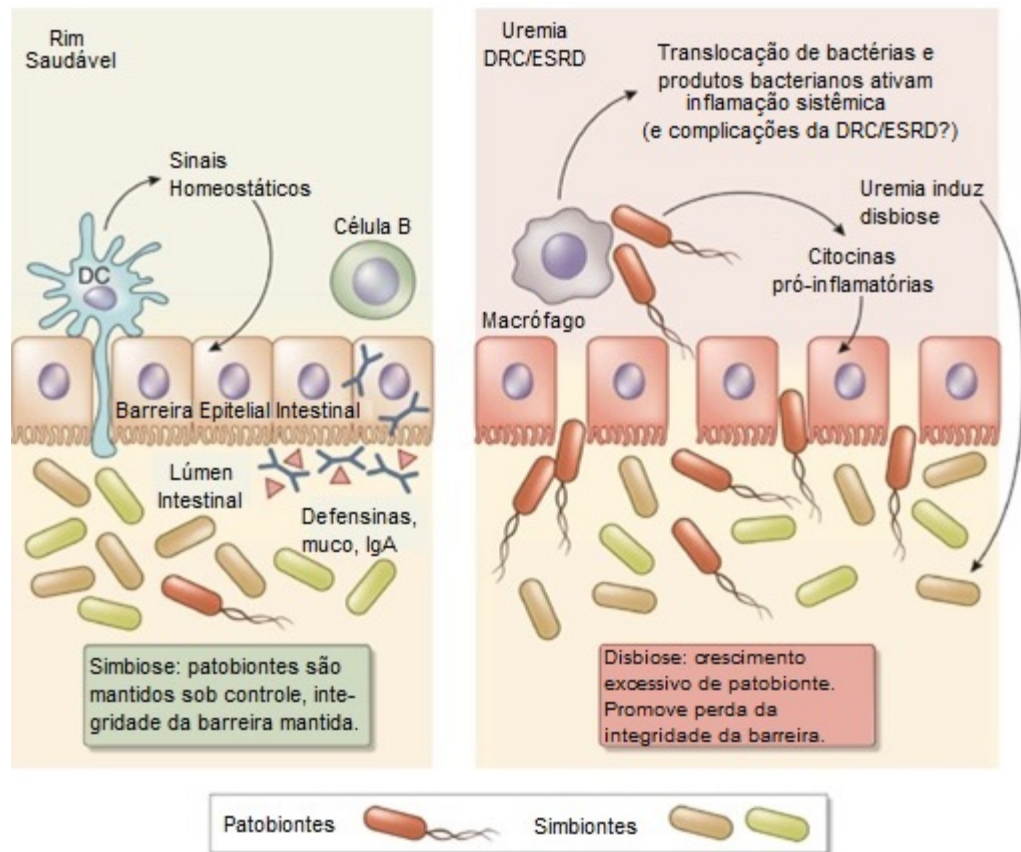
A barreira intestinal do paciente com DM2 encontra-se comprometida (KANBAY et al., 2018), uma vez que o número de bactérias como *Clostridium* e *Proteobacterias* encontra-se aumentada, ocasionando dano à mucosa e aumento da permeabilidade intestinal (JAKOBSSON et al., 2015). Além disso, ocorre uma redução da população de bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* (KANBAY et al., 2018),

cujas funções são fortalecer a barreira intestinal, estabilizando as *tight junctions*, e promovendo a secreção de muco e Imunoglobulina A (IgA) (OHLAND; MACNAUGHTON, 2010). A disfunção da barreira intestinal pode ser um fator importante no desenvolvimento de DM2, já que ocorre liberação de fragmentos pró-inflamatórios como o LPS, que causa resistência à insulina (KANBAY et al., 2018).

Os pacientes DM2 apresentam alterações na produção de metabólitos vindos da microbiota intestinal. A produção de SCFAs encontra-se reduzida no DM2 (KARLSSON et al., 2013). As principais consequências são o aumento da resistência à insulina, redução da secreção de peptídeo semelhante a glucagon-1 (GLP-1) e redução na secreção de insulina (SABATINO et al., 2017). Além disso, estudos demonstram que pacientes com DM2 apresentam maiores níveis de TMAO que pacientes não diabéticos. Esse aumento na concentração sérica foi associado com aumento do risco de eventos cardíacos e mortalidade, independente de controle glicêmico e função renal (TANG et al., 2017). Ainda, foi observado que as vias do TMAO, SCFA e dos ácidos biliares interage com outros hormônios como a grelina, leptina, GLP-1 e peptídeo YY. Sendo assim, algumas delas podem impactar na homeostase da glicose e outros processos metabólicos relacionados à síndrome metabólica (TANG; KITAI; HAZEN, 2017).

Da mesma maneira que no DM2, sugere-se que a barreira intestinal possa apresentar um aumento da permeabilidade na DRC (GULDRIS; PARRA; AMENÓS, 2017). A população de bactérias protetoras encontra-se reduzida, como o *Lactobacillus*. Essas bactérias são consideradas protetoras, pois produzem moléculas nefroprotetoras, como o butirato e vitamina K (CASTILLO-RODRIGUEZ et al., 2018). Já as bactérias proteolíticas, como o *Clostridium* e *Bacteroides*, são encontradas em maior quantidade no intestino de pacientes com DRC, relacionadas com piores desfechos (CASTILLO-RODRIGUEZ et al., 2018).

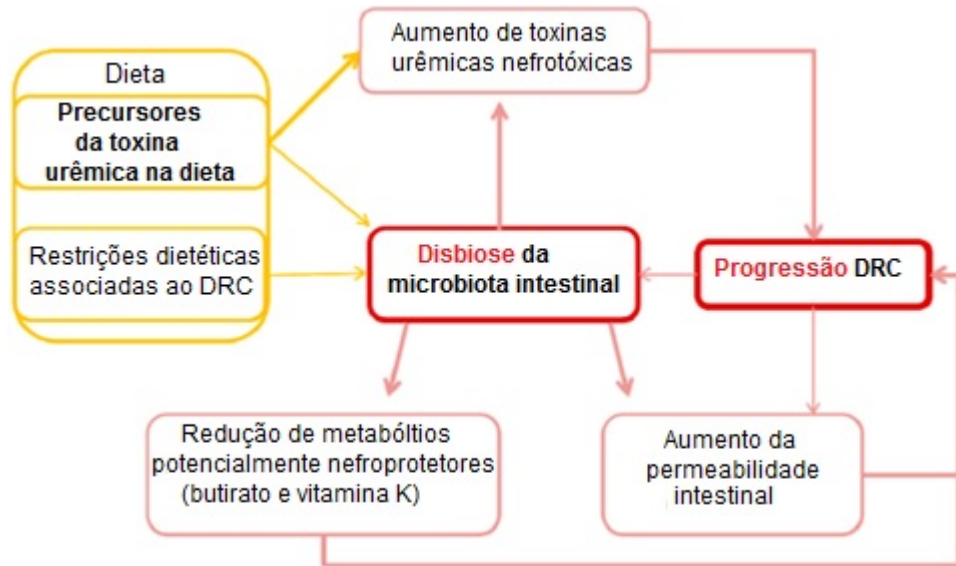
Figura 2: Conceito hipotético sobre como o rim em estágio terminal e a microbiota intestinal afetam uma à outra.



Fonte: Anders et al., 2013.

Um estudo levantou a hipótese de que um ambiente urêmico pode ocasionar disbiose e perda da integridade da barreira intestinal (ANDERS; ANDERSEN; STECHER, 2013), conforme a **Figura 2**. Estudos sugerem uma interação entre o eixo intestino-rim, onde as bactérias intestinais geram metabólitos potencialmente tóxicos (COSOLA et al., 2018; LI; TANG, 2018). Esse processo pode estar envolvido na inflamação sistêmica da DRC e ter papel na progressão da doença (ANDERS; ANDERSEN; STECHER, 2013). Ao mesmo tempo, a DRC pode impactar na composição da microbiota, causando dano na barreira intestinal epitelial, ocorrendo uma translocação de endotoxinas e bactérias do lúmen à corrente sanguínea pelo aumento da permeabilidade intestinal (SABATINO et al., 2015), conforme **Figura 3**.

Figura 3: Relação bidirecional entre a microbiota intestinal e progressão da DRC.



Fonte: Castillo-Rodrigues et al., 2018.

Outros estudos observaram que a uremia, presente na DRC, aumenta o influxo de ureia no lúmen intestinal (RAMEZANI; RAJ, 2013). Isso acarreta em aumento da concentração de bactérias que contêm a urease microbiana, uma enzima bacteriana que realiza a hidrólise da ureia para altas quantidades de amônia, e depois é transformada em hidróxido de amônia (VAZIRI; ZHAO; PAHL, 2016). Estas duas últimas substâncias são as responsáveis por causar ruptura das *tight junctions* presentes na barreira epitelial e posterior aumento da permeabilidade intestinal. Um estudo avaliou diversidade bacteriana de pacientes saudáveis e com ESRD e observou um maior número de famílias de bactérias que possuem urease microbiana nos pacientes em hemodiálise, o que contribuiu na toxicidade urêmica e inflamação sistêmica presente nesses pacientes (WONG et al., 2014).

Os metabólitos, ou toxinas urêmicas, são produzidos pelas bactérias e são solutos que normalmente são excretados pelos rins de um indivíduo saudável. Em pacientes com DRC, porém, eles são retidos pelo rim e se acumulam, por isso são chamados de toxinas urêmicas microbianas (BORGES et al., 2016; NALLU et al., 2017). Estudos observaram que a ruptura das *tight junctions* por essas toxinas parece ser a maior causa de disfunção da barreira intestinal na DRC, já que acarreta em translocação de DNA bacteriano e toxinas à circulação sistêmica, resultando em inflamação sistêmica (SABATINO et al., 2015; TANG; KITAI; HAZEN, 2017),

Tendo em vista o impacto das toxinas urêmicas na progressão da DRC, é importante conhecer suas fontes. Dentro do grupo dos fenóis, o p-cresol e o p-cresol sulfato são produtos da fenilalanina e tirosina. Já o indoxil sulfato é originado da degradação do triptofano e sulfatado no fígado (GULDRIS; PARRA; AMENÓS, 2017). Além de causar a ruptura das *tight junctions*, estas toxinas estão relacionadas com o desenvolvimento de fibrose e deterioração da função renal (MUTSAERS et al., 2015), além de dano endotelial, rigidez arterial e calcificação aórtica (BARRETO et al., 2009).

Já as aminas também possuem um produto do metabolismo intestinal e tem ganhado interesse na área clínica. O TMAO é derivado da colina e L-carnitina e excretado pelos rins (COSOLA et al., 2018). Suas fontes são a carne vermelha, produtos lácteos e gema do ovo. Tendo em vista uma barreira intestinal mais permeável, seu efeito no rim é o aumento da esclerose glomerular e fibrose intersticial, e seu aumento pode ser um preditor de risco cardiovascular e mortalidade em pacientes com DRC (MEIJERS; EVENEPOEL, 2011).

Diversos fatores relacionados ao maior dano a barreira e permeabilidade intestinal estão presentes na vida de pacientes com DRC. Além da uremia, que já foi discutida, o uso de quelantes de fósforo, de antibióticos e da alimentação contribuem para as alterações da microbiota e consequente permeabilidade intestinal (SABATINO et al., 2017). Os pacientes com DRC, principalmente no seu estágio final, possuem diversas restrições alimentares para o controle da hipercalemia. Os alimentos-fonte de potássio, como as frutas e legumes, são ricas em fibras; sua redução no consumo promove redução no número de bactérias produtoras de SCFA, que são nefroprotetoras (WONG et al., 2014) e aumenta o número de bactérias que possuem a urease microbiana. Esta mudança da alimentação pode colocar a produção microbiana de nutrientes em risco e afetar a saúde dos enterócitos (LAU; KALANTAR-ZADEH; VAZIRI, 2015).

É possível observar que em ambas as condições clínicas (DM2 e DRC), ocorrem efeitos negativos na microbiota intestinal, na permeabilidade intestinal e no intestino em si. Os estudos que relacionam a saúde intestinal e as complicações renais no DM2 são escassos. Vale recordar o aumento de marcadores que possibilitam a avaliação da permeabilidade intestinal, como o teste duplo de açúcar, LPS e zonulina. Foi observado que pacientes diabéticos com complicações renais podem ter maiores lesões na mucosa intestinal que pacientes com função renal

normal (ZHONG et al., 2016). Outro estudo que avaliou a microbiota e marcadores de permeabilidade intestinal em pacientes diabéticos com TFG_e < 30 ml/min/1,73m² demonstrou que o grupo DM2-DRC apresentou maior número de bactérias produtoras de TMAO, intestino mais permeável, pelos níveis de zonulina e LPS, e disfunção endotelial, quando comparado aos indivíduos saudáveis (AL-OBAIDE et al., 2017). Tendo em vista a escassez de estudos relacionados e a DRD como uma doença multifatorial, torna-se necessário a avaliação da permeabilidade intestinal em diferentes estágios da DRD, podendo auxiliar na compreensão do impacto da permeabilidade intestinal na doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a permeabilidade intestinal nos indivíduos com Doença Renal do Diabetes, pacientes controles diabéticos sem DRD e indivíduos saudáveis através dos níveis séricos de zonulina.

3.2. Objetivo específico

Correlacionar a permeabilidade intestinal com parâmetros renais, glicêmicos, lipídicos e inflamatórios entre os grupos.

Avaliar o desfecho cardiovascular e renal e óbito após 5 anos da inclusão no estudo.

REFERÊNCIAS

- ADELVANE, Francisco; RODRIGUES, De Paulo. Fisiologia da barreira epitelial intestinal. In: **Sistema Digestório - Integração Básico-Clínica**. [s.l: s.n.]. p. 441–477.
- AL-OBAIDE, Mohammed A. I. et al. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine-N-oxide and Serum Biomarkers in Patients with T2DM and Advanced CKD. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 86, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2077-0383/6/9/86>>. Acesso em: 16 maio. 2019.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 11. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 42, n. Supplement 1, p. S124–S138, 2019. Disponível em: <<http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc19-S011>>
- ANDERS, Hans Joachim; ANDERSEN, Kirstin; STECHER, Bärbel. **The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease** *Kidney International* Elsevier, , 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325079>>. Acesso em: 7 maio. 2019.
- ARON-WISNEWSKY, Judith; CLÉMENT, Karine. The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. **Nature Reviews Nephrology**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 169–181, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrneph.2015.191>>. Acesso em: 9 maio. 2019.
- BARRETO, Fellype C. et al. Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, [s. l.], v. 4, n. 10, p. 1551–1558, 2009. Disponível em: <<http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.03980609>>
- BARRIOS, Clara et al. Gut-microbiota-metabolite axis in early renal function decline. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1–9, 2015.
- BAUMGART, Daniel C.; DIGNASS, Axel U. Intestinal barrier function. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 685–94, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12394645>>. Acesso em: 9 maio. 2019.
- BIBBÒ, S. et al. The role of diet on gut microbiota composition. **European review for medical and pharmacological sciences**, [s. l.], v. 20, n. 22, p. 4742–4749, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27906427>>
- BISCHOFF, Stephan C. et al. Intestinal permeability – a new target for disease

prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 189, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25407511>>. Acesso em: 16 ago. 2019.

BJARNASON, Ingvar; MACPHERSON, Andrew; HOLLANDER, Daniel. Intestinal permeability: An overview. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 108, n. 5, p. 1566–1581, 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0016508595907084>>

BJARNASON I, PETERS TJ, Veall NA (1983). A persistent defect in coeliac disease demonstrated by a 51Cr-labelled EDTA absorption test. *Lancet* 1(8320): 323-325.

BORGES, Natália A. et al. Protein-Bound Uremic Toxins from Gut Microbiota and Inflammatory Markers in Chronic Kidney Disease. **Journal of Renal Nutrition**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 396–400, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1051227616300802>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

BROWN, Eric M.; SADARANGANI, Manish; FINLAY, B. Brett. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 660–667, 2013.

BROWN, Kirsty et al. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. **Nutrients**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 1095–1119, 2012.

BUSNELLI, Marco; MANZINI, Stefano; CHIESA, Giulia. The gut microbiota affects host pathophysiology as an endocrine organ: A focus on cardiovascular disease. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2020.

CANI, Patrice; DELZENNE, Nathalie. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 15, n. 13, p. 1546–1558, 2009. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=15&issue=13&spage=1546>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

CARIELLO, Rita et al. Intestinal permeability in patients with chronic liver diseases: Its relationship with the aetiology and the entity of liver damage. **Digestive and Liver Disease**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 200–204, 2010.

CASTILLO-RODRIGUEZ, Esmeralda et al. Impact of altered intestinal microbiota on chronic kidney disease progression. . 19 jul. 2018, 7, p. 300.

- Chadwick VS, Phillips SF, Hofmann AF (1977). Measurements of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). I. Chemical analysis and biological properties of PEG 400. **Gastroenterology**. 73:241-246.
- Cobden I, Dickinson RJ, Rothwell J, Axon AT (1978). Intestinal permeability assessed by excretion ratios of two molecules: results in coeliac disease. **Br Med J** 2:1060.
- COSOLA, Carmela et al. Microbiota metabolites: Pivotal players of cardiovascular damage in chronic kidney disease. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 130, n. September 2017, p. 132–142, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.003>>
- EVENEPOEL, Pieter et al. Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism. **Kidney International**, [s. l.], v. 76, n. SUPPL. 114, p. S12–S19, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815539057?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 maio. 2019.
- Farquhar MG, Palade GE (1963). Junctional complexes in various epithelia. **J Cell Biol** 17:375-412.
- FASANO, Alessio et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 355, n. 9214, p. 1518–1519, 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600021693>>
- FASANO, Alessio. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 151–175, 2011. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00003.2008>>
- FICEK, Joanna et al. Relationship between plasma levels of zonulin, bacterial lipopolysaccharides, d-lactate and markers of inflammation in haemodialysis patients. **International Urology and Nephrology**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 717–725, 2017.
- FLOCH, Martin; RINGEL, Yehuda; WALKER, W. Allen. **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology**. 1. ed. [s.l.] : Academic Press, 2016.
- Fordtran JS, Rector FC, Ewton MF, Soter N, Kinney J (1965). Permeability characteristics of the human small intestine. **J Clin Invest** 44:1935-1944.
- Gryboski JD, Thayer WR, Jr., Gabrielson IW, Spiro HM (1963). Disacchariduria in gastrointestinal disease. **Gastroenterology** 45:633-637.

GULDRIS, Secundino Cigarran; PARRA, Emilio González; AMENÓS, Aleix Cases. Gut microbiota in chronic kidney disease. **Nefrología (English Edition)**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 9–19, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2013251417300202>>. Acesso em: 7 maio. 2019.

HASSLACHER, Christoph et al. Serum zonulin as parameter of intestinal permeability in longstanding type 2 diabetes: correlations with metabolism parameter and renal function. **Journal of Diabetes, Metabolic Disorders & Control**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 58–62, 2018. Disponível em: <<http://medcraveonline.com>>. Acesso em: 4 dez. 2019.

Hewett (1924). **Biochem Journal** 18.

Hober R, Hober J (1937). Experiments on the absorption of organic solutes in the small intestine of rats. **J Cell Comp Physiol** 10:401-410.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. [s.l.] : International Diabetes Federation, 2017. Disponível em: <www.diabetesatlas.org>.

JAKOBSSON, Hedvig E. et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. **EMBO reports**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 164–177, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/embr.201439263>>

JAYASHREE, B. et al. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 388, n. 1–2, p. 203–210, 2014.

KANBAY, M. et al. The crosstalk of gut microbiota and chronic kidney disease: role of inflammation, proteinuria, hypertension, and diabetes mellitus. **International Urology and Nephrology**, Division of Nephrology, Department of Medicine, Koc University School of Medicine, Rumelifeneri Yolu, Sariyer, Istanbul, 34450, Turkey, v. 50, n. 8, p. 1453–1466, 2018. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85046468638&doi=10.1007%2Fs11255-018-1873-2&partnerID=40&md5=af2bf3a50a6f489996da6d28c55c2d37>>

KARLSSON, Fredrik H. et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. **Nature**, [s. l.], v. 498, n. 7452, p. 99–103, 2013.

KDIGO. Chapter 3: Management of progression and complications of CKD. **Kidney International Supplements**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 73–90, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2157171615311035>>

KOETH et al., Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. **Nature Medicine**, 2013; 19(5).

KONG, Shanshan; ZHANG, Yanhui H.; ZHANG, Weiqiang. **Regulation of intestinal epithelial cells properties and functions by amino acids** *BioMed Research International*, 2018.

LAU, Wei Ling; KALANTAR-ZADEH, Kamyar; VAZIRI, Nosratola D. The Gut as a Source of Inflammation in Chronic Kidney Disease. **Nephron**, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 92–98, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25967288>>. Acesso em: 7 maio. 2019.

LEECH, Bradley et al. Risk factors associated with intestinal permeability in an adult population: A systematic review. **International Journal of Clinical Practice**, [s. l.], n. June, p. 1–26, 2019.

LI, Daniel Y.; TANG, W. H. Wilso. **Contributory Role of Gut Microbiota and Their Metabolites Toward Cardiovascular Complications in Chronic Kidney Disease** *Seminars in Nephrology*, 2018.

Lister M (1673). A letter. **Philos. Trans. R. Soc.** London 8:6060-6065

LUKASZYK, Ewelina et al. Zonulin, inflammation and iron status in patients with early stages of chronic kidney disease. **International Urology and Nephrology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 121–125, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11255-017-1741-5>>

MALYSZKO, Jolanta et al. Zonulin, iron status, and anemia in kidney transplant recipients: Are they related? **Transplantation Proceedings**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 2644–2646, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.09.018>>

MEIJERS, B. K. I.; EVENEPOEL, P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 759–761, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfq818>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

MORENO-NAVARRETE, José María et al. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, 2012.

MUELLER, Noel T. et al. Effects of high-fiber diets enriched with carbohydrate, protein, or unsaturated fat on circulating short chain fatty acids: results from the OmniHeart randomized trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], 2020.

- MUTSAERS, Henricus A. M. et al. Chronic Kidney Disease and Fibrosis: The Role of Uremic Retention Solutes. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 2, n. AUG, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmed.2015.00060/abstract>>
- NALLU, Anitha et al. Gut microbiome in chronic kidney disease: challenges and opportunities. **Translational Research**, [s. l.], v. 179, p. 24–37, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2016.04.007>>
- OHLAND, Christina L.; MACNAUGHTON, Wallace K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, [s. l.], v. 298, n. 6, 2010.
- OHLSSON, Bodil; ORHO-MELANDER, Marju; NILSSON, Peter. Higher Levels of Serum Zonulin May Rather Be Associated with Increased Risk of Obesity and Hyperlipidemia, Than with Gastrointestinal Symptoms or Disease Manifestations. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 582, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/582>>. Acesso em: 6 maio. 2019.
- OLIVEIRA, Alynne Moniellen; HAMMES, Thais Ortiz. Microbiota e barreira intestinal: implicações para obesidade. **Clinical & Biomedical Research**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 222–229, 2016. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/2357-9730.67683>>
- OSTERHOUNT, W. J. V. The permeability of protoplasm to ions and the theory of antagonism. **Science**, v. 35, p. 112-115, 1912.
- PENG, Luying et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. **The Journal of nutrition**, [s. l.], v. 139, n. 9, p. 1619–25, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625695>>. Acesso em: 16 maio. 2019.
- RAMEZANI, Ali; RAJ, Dominic S. The Gut Microbiome, Kidney Disease, and Targeted Interventions. **Journal of the American Society of Nephrology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 657–670, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24231662>>. Acesso em: 7 maio. 2019.
- ROCCO, Michael V.; BERNIS, Jeffrey S. KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD: 2012 update. **American Journal of Kidney Diseases**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 850–886, 2012. Disponível em: <[https://www.ajkd.org/article/S0272-6386\(12\)00957-](https://www.ajkd.org/article/S0272-6386(12)00957-)

2/pdf>. Acesso em: 6 maio. 2019.

SABATINO, Alice et al. Alterations of intestinal barrier and microbiota in chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 924–933, 2015.

Disponível em: <<https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfu287>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

SABATINO, Alice et al. Intestinal Microbiota in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease. **Current Diabetes Reports**, [s. l.], v. 17, n. 3, 2017.

SEKIROV, Inna et al. Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 859–904, 2010. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00045.2009>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLOS Biology**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002533>>

STURGEON, Craig; FASANO, Alessio. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. **Tissue Barriers**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. e1251384, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28123927>>. Acesso em: 17 maio. 2019.

TANG, W. H. Wilso. et al. Increased trimethylamine N-oxide portends high mortality risk independent of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 297–306, 2017.

TANG, W. H. Wilson; KITAI, Takeshi; HAZEN, Stanley L. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. **Circulation Research**, [s. l.], v. 120, n. 7, p. 1183–1196, 2017. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715>>. Acesso em: 10 maio. 2019.

TERPSTRA, Matty L. et al. Measurement of the intestinal permeability in chronic kidney disease. **World Journal of Nephrology**, [s. l.], 2016.

TOJO, Rafael et al. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 41, p. 15163–15176, 2014. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i41/15163.htm>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

TRØSEID, Marius et al. Plasma lipopolysaccharide is closely associated with glycemic

control and abdominal obesity: Evidence from bariatric surgery. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 3627–3632, 2013.

TRUMAN, Harry S. et al. Diabetic Kidney Disease: A Report From an ADA Consensus Conference. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 37, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4170131/pdf/2864.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

ULLUWISHEWA, Dulantha et al. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 141, n. 5, p. 769–776, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/141/5/769/4600243>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

USSING, HANS H.; ZERAHN, K. Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. **Acta Physiologica Scandinavica**, [s. l.], v. 23, n. 2–3, p. 110–127, 1951. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x>>

VANCAMELBEKE, Maaïke; VERMEIRE, Séverine. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 821–834, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>>

VAZIRI, Nosratola D. et al. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: A likely cause of CKD-associated inflammation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 2686–2693, 2012.

VAZIRI, Nosratola D.; ZHAO, Ying Yong; PAHL, Madeleine V. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: The nature, mechanisms, consequences and potential treatment. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 737–746, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfv095>>. Acesso em: 7 maio. 2019.

WONG, Jakk et al. Expansion of Urease- and Uricase-Containing, Indole- and p-Cresol-Forming and Contraction of Short-Chain Fatty Acid-Producing Intestinal Microbiota in ESRD. **American Journal of Nephrology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 230–237, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643131>>. Acesso em: 10 maio. 2019.

WU, Gary D. et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes.

Science, [s. l.], v. 334, n. 6052, p. 105–108, 2011.

XING, Peter Yuli; PETTERSSON, Sven; KUNDU, Parag. Microbial Metabolites and Intestinal Stem Cells Tune Intestinal Homeostasis. **PROTEOMICS**, [s. l.], p. 1800419, 2020. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.201800419>>

ZHONG, Hao-Jie et al. Type 2 Diabetes Mellitus Is Associated with More Serious Small Intestinal Mucosal Injuries. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. e0162354, 2016.

Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0162354>>

4. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Título: ZONULINA SÉRICA COMO MARCADOR DE PERMEABILIDADE INTESTINAL NA DOENÇA RENAL DO DIABETES

Revista de escolha: PlosOne

Fator de impacto (2018): 2.776

ISSN: 1932-6203

ZONULINA SÉRICA COMO MARCADOR DE PERMEABILIDADE INTESTINAL NA DOENÇA RENAL DO DIABETES

Larissa Salomoni Carpes¹, RD, Luis Henrique Canani², PhD, Jakeline Rheinheimer²,
Daisy Crispim², PhD, Gabriela Corrêa Souza^{1,4}, PhD

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Nutrição, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Autor correspondente:

Gabriela Corrêa Souza

Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350; 2º andar; sala 2201F

90035-903 – Porto Alegre, RS – Brasil

Telefone/ Fax: +55-51-3359-7313

Email: gabriela.souza@ufrgs.br

Resumo

A zonulina foi reconhecida como uma proteína responsável por realizar a abertura das tight junctions no epitélio intestinal. Ela está relacionada com doenças como obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus (DM) e doença renal crônica (DRC). Seu mecanismo na DRC não foi totalmente elucidado. O objetivo deste estudo é avaliar a permeabilidade intestinal através da zonulina sérica em pacientes com Doença Renal do Diabetes. Este é um estudo caso-controle que incluiu quatro grupos de estudos: 1) controle não-DM2: sem DM2 ou DRC; 2) controle DM2: pacientes diabéticos sem função renal prejudicada; 3) DM2 albuminúricos: pacientes diabéticos com albuminúria (EUA) > 30 mg/g de creatinina, mas taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) > 60 ml/min/1,73 m³; 4) DRD: pacientes diabéticos com EUA > 30 mg/g de creatinina e TFGe < 60 ml/min/1,73 m³. Os níveis séricos de zonulina foram dosados por teste ELISA, e correlacionados com parâmetros renais, glicêmicos, lipídicos, inflamatórios e de composição corporal. Foram incluídos 86 indivíduos. O grupo controle DM2 apresentou os maiores níveis de zonulina quando comparado ao grupo DRD ([131,3 (83,0-170,5) vs. 63,7 (45,0-106,0) µg/mL; p = 0,004].), apresentando diferença com todos os outros grupos após transformação logarítmica e ajustes para LDL-colesterol, força do aperto de mão e percentual de gordura corporal (p = 0,003), mostrando uma permeabilidade intestinal prejudicada quando comparado aos outros grupos. Houve correlação positiva entre zonulina e colesterol total, LDL-colesterol e força de aperto de mão. Correlações negativas entre zonulina e proteinúria, albuminúria, gordura corporal e duração do DM foram observadas. A zonulina sérica demonstrou uma barreira intestinal mais permeável nos pacientes controles DM2. Menores níveis séricos de zonulina foram associados com maiores desfechos renais, porém seu mecanismo deve ser melhor compreendido.

Palavras-chave: zonulina, permeabilidade intestinal, doença renal do diabetes, diabetes mellitus, doença renal crônica

ABSTRACT

Zonulin is a protein responsible for opening the tight junctions complex at the intestinal epithelium. It is related with diseases such as obesity, cardiovascular diseases, diabetes mellitus (DM) and chronic kidney disease (CKD). Its function in CKD wasn't totally elucidated yet. This study aimed to evaluate intestinal permeability measuring serum zonulin in patients with diabetes kidney disease (DKD). This is a case-control study that included four study groups: 1) non-DM controls: without DM2 nor CKD; 2) DM2 controls: diabetics patients without impaired kidney function; 3) DM2 albuminurics: diabetics patients with albuminuria (UAE) > 30mg/g creatinine, but with estimated glomerular filtration rates (eGFR) > 60ml/min/1,73 m²; 4) DKD: diabetics patients with UAE > 30mg/g creatinine and eGFR < 60ml/min/1,73 m². Serum levels of zonulin were dosed by ELISA kit and correlated with kidney, glycemic, lipidic, inflammatory and corporal composition parameters. Eighty-six individuals were included. DM2 control group presented higher levels of zonulin when compared to DKD group ([131,3 (83,0-170,5) vs. 63,7 (45,0-106,0) µg/mL; P = 0,004]), showing difference with all other groups after logarithmical transformations and adjusted to LDL-cholesterol, handgrip strength and body fat (P= 0,003), showing an impaired intestinal permeability. Positive correlations have been occurred between zonulin and total cholesterol, LDL-cholesterol and handgrip strength. Negative correlations have been showed between zonulin and proteinuria, albuminuria, body fat and DM duration. Serum zonulin showed a more permeable intestinal barrier in DM2 control subjects, Lower zonulin levels were associated with greater renal outcomes, however its mechanisms should be better understood.

Key-words: zonulin; intestinal permeability; diabetic kidney disease; type 2 diabetes; chronic kidney disease.

Introdução

Tem-se observado um possível papel da microbiota intestinal na fisiopatologia do DM [1] e da DRC [2]. Em ambos os casos, sugere-se uma redução da população de bactérias benéficas e proliferação de bactérias maléficas, como *Clostridium* e *Proteobacterias* [3], o que é chamado de disbiose. Em pacientes com DRC avançada, ocorre aumento de bactérias que possuem a enzima urease microbiana, responsável por hidrolisar a ureia em excesso encontrada no intestino, transformando-a em amônia [4]. Tendo em vista a função renal reduzida, seu acúmulo torna-se tóxico, impactando na permeabilidade intestinal e na progressão da DRC [5,6], formando um ciclo que se retroalimenta.

Quando a barreira intestinal encontra-se prejudicada, instala-se um quadro de inflamação sistêmica, o que permite a entrada de bactérias (translocação bacteriana) e outras substâncias patogênicas para a circulação pelo aumento da permeabilidade intestinal [7]. Fatores como dieta, uso de alguns medicamentos, microbiota, ingestão alcoólica e tabagismo influenciam na barreira e em sua permeabilidade [8].

A zonulina é uma proteína produzida no intestino e em células hepáticas, que regula um complexo proteico chamado de *tight junctions* [9]. Sua função é regular a passagem de moléculas entre o lúmen intestinal e a corrente sanguínea. A zonulina é estimulada, principalmente, por bactérias e pela proteína do glúten (gliadina), realizando a abertura das células intestinais, tornando o intestino mais permeável [10]. Altos níveis de zonulina têm sido associados com o aumento da permeabilidade intestinal, uma vez que a zonulina induz a quebra das junções entre as células epiteliais do intestino [11].

A Doença Renal do Diabetes (DRD) acomete 20 a 40% dos pacientes diabéticos [12]. Estudos mostram associação entre zonulina sérica e DM2 [13], e DRC

[14], porém existem inconsistências em relação aos resultados de estudos com essas patologias. Sendo a DRD uma doença multifatorial, torna-se necessário a avaliação da permeabilidade intestinal em diferentes estágios da DRD. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar a permeabilidade intestinal através dos níveis séricos de zonulina em pacientes com DRD e compará-los com indivíduos saudáveis e indivíduos diabéticos com e sem albuminúria.

Materiais e Métodos

Desenho e Pacientes

O desenho deste estudo foi previamente descrito [15]. Foram incluídos pacientes que realizavam atendimento no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os pacientes foram separados em 4 grupos, pareados conforme sexo, idade e índice de massa corporal (IMC) e de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (eTFG), albuminúria (EUA) e presença de diabetes. 1) DRD: pacientes DM2 com albuminúria e $TFGe < 60 \text{ ml/min/1,72m}^2$. 2) DM2 albuminúricos: pacientes DM2 com albuminúria ($EUA > 30\text{mg/g}$ de creatinina) e $TFGe \geq 60 \text{ ml/min/1,72m}^2$; 3) controles diabéticos: pacientes com DM2, $EUA < 30 \text{ mg/g}$ de creatinina e $eTFG \geq 60 \text{ ml/min/1,72m}^2$; 4) controles não-diabéticos: indivíduos sem diabetes, $EUA < 30 \text{ mg/g}$ creatinina e $TFGe \geq 60 \text{ ml/min/1,72m}^2$; Os critérios de exclusão do estudo consistiram em idade menor que 18 anos, câncer, pancreatite, estar realizando diálise, infecção aguda, transplante prévio, gravidez, abuso de álcool ou drogas. O critério de exclusão do atual estudo foi a não autorização do uso de dados para novos estudos e zonulina sérica maior que 400 ng/mL.

Os pacientes foram definidos com DM2 conforme os critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA) [16]. O diagnóstico de redução da função renal foi feito de acordo com a fórmula de Chronic Kidney Disease – Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) [17].

Avaliação de dados clínicos, antropométricos e bioquímicos

Todos os pacientes foram submetidos a uma entrevista após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, além de exame físico e laboratorial. Os dados clínicos e sociodemográficos foram coletados por questionários e prontuário eletrônico, incluindo idade, gênero, etnia, duração do DM2, hipertensão e uso de medicamentos.

A avaliação antropométrica consistiu em peso e estatura aferidos em balança antropométrica com estadiômetro acoplado, para posterior cálculo de IMC. A composição corporal foi avaliada por bioimpedância elétrica (*InBody 230; Biospace, Seul, Korea*). Todas as medidas foram realizadas com o paciente em jejum, roupas leves e sem sapatos [18]. A força de preensão palmar (FPP) foi avaliada pelo Dinamômetro mecânico Jamar, enquanto o paciente encontrava-se sentado, com apoio nas costas e o braço flexionado em ângulo de 90°. O paciente deveria segurar o aparelho com o máximo de força por 3 segundos, com três repetições. O valor mais alto entre as três medidas foi utilizado [19].

Amostras de sangue foram coletadas após 12 horas em jejum. Foram avaliados os níveis de glicose em jejum (Hexoquinase UV enzimática), hemoglobina glicada (HbA1c) (HPLC), colesterol total (CT) (colorimétrico enzimático), colesterol-HDL (colorimétrico enzimático homogêneo), triglicerídeos (TG) (colorimétrico enzimático), proteína C-reativa ultrasensível (PCRus) (imunoturbidimetria), albuminúria

(imunoturbidimetria), proteinúria (turbidimetria) e creatinina sérica (método de Jaffé). Colesterol-LDL foi calculado de acordo com a fórmula de Fridelwald: $LDL = CT - (HDL + TG/5)$, quando TG menor que 400 µg/mL. Além disso, amostra de urina também foi coletada.

As amostras de sangue foram coletadas, centrifugadas e armazenadas em -80°C para posterior quantificação de zonulina e interleucina-6 (IL-6). As concentrações de zonulina foram avaliadas por amostras séricas, utilizando o kit de ELISA para zonulina (USCN, China). A sensibilidade do teste foi de 2,92 ng/mL e a faixa do teste foi 6,25-400 ng/mL, enquanto que a variabilidade entre testes foi menor que 12% para amostras séricas. Todas as amostras de zonulina foram feitas em duplicata. As concentrações de IL-6 foram medidas em amostras séricas, utilizando o kit ELISA Human IL-6 Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Apenas 30,7% das amostras foram realizadas em duplicata para a análise de IL-6.

Os desfechos avaliados após 5 anos foram: perda de função renal (pacientes que apresentaram piora da TFG ou albuminúria), início de diálise ou transplante renal, acidente vascular cerebral (AVC), infarto (IAM), procedimentos cardiovasculares e óbito. Eles foram definidos como desfecho renal, cardiovascular e morte, e foram coletados de prontuário ou ligação telefônica.

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa *Statistical Package for Social Sciences*, v18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Variáveis contínuas foram testadas por Shapiro-Wilk. Para realizar as comparações entre os grupos, foi realizada a Análise de Variâncias (ANOVA) com testes de Levene ou Tukey, Qui-Quadrado ou Kruskal-Wallis com teste de Dunn, conforme necessário. Como as concentrações de zonulina

apresentaram distribuição assimétrica, a variável foi transformada em logaritmo para a realização das correlações por Pearson ou Spearman. As variáveis significativas nas correlações e que não foram utilizadas para o diagnóstico de DM2 e DRC foram utilizadas no modelo de regressão linear multivariável, sendo a zonulina a variável dependente, com ajustes para LDL, FAM e percentual de gordura corporal. Os desfechos foram avaliados por teste t de student e regressão de Poisson.

O cálculo do tamanho amostral foi baseado em estudo prévio [20], considerando um desvio padrão = 4, tamanho de efeito = 0,54, poder de 95% e nível de significância menor que 5%. A amostra total estimada foi de 56 indivíduos.

Resultados

Este estudo incluiu 86 pacientes divididos em quatro grupos, conforme presença de diabetes e função renal. Os dados sociodemográficos e clínicos encontram-se na Tabela 1. A faixa etária foi semelhante entre os grupos (controle não DM: $59,50 \pm 10,37$; controle DM: $59,73 \pm 9,15$; DM2 albuminúricos: $64,05 \pm 8,63$; DRD: $61,68 \pm 9,99$; $p = 0,391$). A maioria dos sujeitos era do sexo feminino e caucasiano, sem diferença entre os grupos ($p = 0,755$ e $p = 0,808$; respectivamente). A duração da doença foi similar nos pacientes diabéticos, ademais apresentavam um prevalência maior de hipertensão que o grupo controle não-DM ($p < 0,001$). Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao tabagismo.

Em relação às variáveis antropométricas e laboratoriais, os níveis de PCRus, colesterol total, IMC e composição corporal não demonstraram diferença significativa entre os grupos (Tabela 1). O grupo DRD apresentou maiores níveis de IL-6 ($p < 0,001$), menores níveis de HDL ($p = 0,026$) e LDL ($p = 0,008$), quando comparado aos outros

grupos. Elevados níveis de triglicerídeos também foram observados nos grupos DM2 albuminúricos e DRD ($p=0,007$).

Maiores níveis zonulina sérica foram encontrados no grupo controle DM2, quando comparado ao grupo DRD [131,3 (83,0-170,5) vs. 63,7 (45,0-106,0) $\mu\text{g/mL}$; $p = 0,004$] antes da transformação logarítmica. Os grupos controle não-DM [87,35 (54,7-111,8) $\mu\text{g/mL}$] e DM2 albuminúricos [73,4 (57,2-122,2) $\mu\text{g/mL}$] não apresentaram diferença entre si e os outros grupos.

Na Figura 1 podem-se observar os níveis de zonulina nos diferentes grupos após transformação logarítmica e análise de regressão multivariada com ajustes para LDL, gordura corporal e FAM, sendo observada diferença entre o grupo controle DM e os outros três grupos [(131,35 (83,0-170,5) vs. controle não-DM 87,25 (54,7-111,8); DM2 albuminúricos 73,37 (51,8-122,2); e DRD 63,72 (45,03-106,0); $p=0,003$]. O grupo DM2 permaneceu com os maiores níveis de zonulina sérica ($p = 0,003$). Os grupos controle não-DM, DM2 albuminúricos e DRD não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si nas concentrações de zonulina.

A zonulina apresentou correlação positiva com TFGe ($r = 0,222$; $p=0,040$), colesterol total ($r = 0,299$; $p=0,034$), LDL ($r = 0,258$; $p=0,021$), e FAM ($r = 0,276$; $p=0,011$) e negativa com proteinúria ($r = -0,214$; $p=0,048$), albuminúria ($r = -0,243$; $p=0,024$), duração do diabetes ($r = -0,239$; $p=0,049$) e gordura corporal ($r = -0,271$; $p=0,014$) (Tabela 2).

Após 5 anos, 65 pacientes (75,6% da amostra) foram avaliados para desfechos renais, cardiovasculares e óbito. Em relação aos desfechos renais, 24 pacientes tiveram redução da função renal (39,3%), 10 pacientes iniciaram diálise (15,5%), e apenas 1 paciente realizou transplante renal (1,5%). Entre os desfechos cardiovasculares, 6 pacientes sofreram infarto agudo do miocárdio (9,2%), 3 pacientes

tiveram AVC (4,6%), 7 pacientes realizaram algum tipo de cirurgia cardiovascular (10,8%) e 9 pacientes faleceram (13,8%).

Os pacientes que apresentaram desfechos renais tinham menores concentrações de zonulina ($p=0,007$). Outros desfechos não apresentaram diferença significativa nos níveis de zonulina (Tabela 3). Ao analisar todos os desfechos juntos foi observado que concentrações de zonulina abaixo do terceiro tercil ($127 \mu\text{g/mL}$) aumentam o risco de algum destes desfechos em 176%, conforme descrito na Tabela 4.

Discussão

No estudo em questão, os pacientes diabéticos com função renal normal e sem albuminúria apresentaram maiores níveis de zonulina quando comparado aos grupos controle não-DM, DM2 albuminúricos e DRD. Além disso, foram observadas correlações dos níveis séricos de zonulina com função renal, perfil lipídico e composição corporal. Já em relação aos desfechos maiores, concentrações reduzidas de zonulina sérica foram significativamente associadas com desfechos renais.

A zonulina tem sido utilizada como marcador de permeabilidade intestinal no DM2 [21]. Ao compararmos apenas o grupo controle não-DM2 e o controle DM2, os resultados deste trabalho - níveis séricos de zonulina maiores em pacientes com DM - corroboram com outros estudos. Um estudo encontrou maiores níveis de zonulina em pacientes com DM2, cuja duração da doença era de 13 anos, ao comparar com o grupo controle [22]. Independente da duração do DM, essa associação parece estar bem estabelecida. Em pacientes chineses recém-diagnosticados com DM2 foi demonstrado maiores níveis de zonulina, quando comparado aos controles [13]. Outro estudo observou concentrações maiores de zonulina em pacientes com pré-diabetes

quando comparados aos indivíduos saudáveis, ambos os grupos com função renal semelhante [23]. Estes estudos sugerem que o aumento de zonulina em pacientes DM2 demonstra uma maior permeabilidade intestinal que indivíduos saudáveis, podendo estar relacionado com a fisiopatologia do diabetes.

Poucos estudos avaliaram a zonulina em pacientes renais, e seus resultados são divergentes. No presente estudo, pacientes dos grupos DRD e DM2 albuminúricos apresentaram níveis semelhantes de zonulina que controle não-DM. Ao avaliar a zonulina como um possível marcador inflamatório, valores similares foram encontrados entre pacientes em pré-diálise e indivíduos saudáveis [24] em um estudo de coorte prospectiva, corroborando com os nossos resultados. No entanto, dois estudos poloneses demonstraram menores concentrações de zonulina em pacientes com DRC (estágios 2 a 4) e em transplantados renais estáveis (TFG 52 ± 16 ml/min/1,73 m²) [25], quando comparado aos controles. Um estudo americano também encontrou resultados diferentes que os nossos achados, onde o grupo DM2 em pré-diálise (TFG 16 ± 3 ml/min/1,73 m²) apresentou maiores níveis de marcadores de permeabilidade intestinal, como zonulina, LPS e TMAO, que indivíduos saudáveis [26].

Em outro estudo, ao avaliar pacientes em hemodiálise (HD), os valores de zonulina encontrados são maiores comparando tanto indivíduos saudáveis [20] e como em pré-diálise [24]. Uma hipótese que os autores trazem é de que o aumento de zonulina seja resultado da sua menor eliminação renal [20]. Entretanto, chama atenção que grupos com menor função renal nem sempre apresentam maiores níveis de zonulina, ou seja, outros fatores, que não somente a função renal podem estar envolvidos com os níveis séricos de zonulina.

Em relação aos parâmetros inflamatórios, nosso estudo não encontrou correlações significativas com níveis de PCRus ou IL-6. Estudos que avaliaram pacientes com pré-diabetes e diabetes encontraram associação positiva entre os níveis de IL-6 e de zonulina [13,27], referindo que a zonulina e resistência à insulina podem ser mediadas pela aumento de IL-6 relacionado à obesidade. Vale ressaltar que nossos achados demonstram que o grupo DRD avançada foi o único a apresentar elevados valores de IL-6. Outro estudo que avaliou a zonulina como possível marcador inflamatório em pacientes com diferentes estágios da DRC observou que os pacientes que apresentaram IL-6 elevada tinham menores níveis de zonulina que os controles [14].

Nossos achados demonstram uma correlação positiva de zonulina sérica com TFGe, além de uma correlação negativa com albuminúria e proteinúria, ou seja, o aumento de zonulina foi correlacionado com o aumento da função renal. O aumento da permeabilidade é resultante da expressão de zonulina, com posterior ativação de moléculas como o receptor de fator de crescimento epidérmico e receptor ativado por proteinase 2 [11]. Da mesma forma, estudos demonstraram uma correlação negativa entre zonulina e proteinúria em pacientes há 13 anos com DM2 [22], e positiva com TFG em pacientes com insuficiência cardíaca [28], corroborando com os resultados deste estudo. Ambos os estudos sugerem que a depleção da zonulina ocorre no rim, devido a perda de função renal. Ao excluirmos os controles não-DM, podemos observar que aqueles com algum comprometimento renal, como albuminúria e proteinúria e/ou TFG <60 ml/min/1,73 m², parecem ter menores níveis de zonulina, possivelmente sendo excretada no rim.

Um estudo avaliando a zonulina em pacientes pré-diálise e hemodiálise sugere que ela pode ser utilizada no monitoramento da progressão da doença renal [24].

Entretanto, o possível mecanismo renal envolvido ainda é desconhecido e sugere-se que a zonulina possa ter outra função na DRC, que não a avaliação da permeabilidade intestinal. Uma revisão sistemática encontrou resultados conflitantes em relação aos métodos de avaliação de permeabilidade na DRC, principalmente o teste duplo de açúcar. Os autores concluem que pacientes com DRC apresentam uma permeabilidade intestinal prejudicada, porém deve-se interpretar os dados com cautela, e novos marcadores que não sofram influência renal ou de bactérias intestinais são necessários [29].

Ainda, os estudos que avaliaram pacientes com pré-diabetes observaram a zonulina elevada associada ao aumento de triglicerídeos e colesterol total [13,27], com a possível explicação de que a comunicação entre intestino e tecido adiposo é um fator na dislipidemia. Um estudo demonstrou que a zonulina permaneceu elevada, mesmo após redução de peso e melhora de parâmetros lipídicos e glicêmicos no final de uma intervenção dietética de 12 semanas, e apresentou correlação positiva com LDL, colesterol total e triglicerídeos, com a possível explicação que a melhora ocorreu por alterações endócrinas e não da microbiota intestinal [30]. Nossos resultados encontraram uma correlação positiva entre zonulina e aumento do perfil lipídico pelo colesterol total e LDL, o que corroborou com outros estudos.

Quando avaliamos desfechos maiores, observamos menores concentrações de zonulina sérica em pacientes que apresentaram desfechos renais, como redução da função renal e início de hemodiálise em 5 anos após a inclusão no estudo. Os grupos DM2 albuminúricos e DRD apresentaram menores níveis de zonulina. Este resultado parece sugerir que a redução de zonulina pode ser um indicador de gravidade da doença, tais como desfechos renais e maior número de óbitos. Recordando que os pacientes DM2 com função renal preservada apresentaram

maiores níveis de zonulina. Uma hipótese para o possível mecanismo é o aumento de permeabilidade do glomérulo renal, com o aumento de albuminúria e proteinúria, permitindo a entrada de zonulina, o que impacta na saúde renal. Um estudo que avaliou a integridade intestinal de pacientes com HIV mostrou que maiores níveis de zonulina parecem prever sobrevida [31]. Ainda, ao avaliar marcadores relacionados com mortalidade cardiovascular e por todas as causas, um estudo com pacientes com insuficiência cardíaca demonstrou uma associação inversa entre zonulina e calprotectina, quinurenina e homoarginina, ou seja, menores níveis de zonulina podem indicar pior prognóstico [28].

Este estudo apresenta algumas limitações, como não ter sido possível realizar a dosagem urinária de zonulina. Além disso, tendo em vista que este é um subestudo, os outros fatores que podem influenciar na permeabilidade intestinal não foram avaliados na época de coleta. O tamanho da amostra é relativamente pequeno, porém tivemos poder de 99,6% para condução do estudo, baseado em cálculo de tamanho amostral prévio.

É importante notar que este é o primeiro estudo que avalia as concentrações de zonulina sérica nas complicações renais do DM2 em indivíduos brasileiros, com avaliação de desfechos maiores. A zonulina sérica parece ser um marcador de permeabilidade intestinal prejudicada em pacientes diabéticos com função renal normal. Entretanto, o impacto da DRC nos níveis séricos de zonulina não é totalmente elucidado. Sendo assim, o uso deste marcador como indicador de aumento de permeabilidade intestinal na DRD deve ser melhor estabelecido e ser utilizado com cautela.

Agradecimentos e financiamento

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE 2018-0421) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (www.hcpa.edu.br).

Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho de estudo, coleta e análise de dados, ou preparação do manuscrito.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse.

	Controle não-DM (n = 18)	Controle DM2 (n = 26)	DRD Albuminúricos (n =20)	DRD avançada (n = 22)	P valor
Idade (anos)	59,50 ± 10,37	59,73 ± 9,15	64,05 ± 8,63	61,68 ± 9,99	0,391
Sexo feminino, n (%)	11 (61,1)	14 (53,8)	13 (65,0)	11 (50,0)	0,755
Caucasiano, n (%)	11 (61,1)	18 (69,2)	15 (75)	14 (63,6)	0,808
Não tabagista, n (%)	9 (50,0)	14 (53,8)	9 (45,0)	13 (59,1)	0,540
Duração do DM2 (anos)	-	15,57 ± 9,49	14,3 ± 7,98	18,22 ± 9,24	0,353
Hipertensão, n (%)	5 (33,3) ^a	25 (96,2) ^b	20 (100) ^b	22 (100) ^b	<0,001
TFGe (mL/min/1,73m ²)	100,0 (88,45-114,25) ^a	95,1 (85,38-116,25) ^a	98,0 (92,0-106,0) ^a	23,0 (17,0-33,64) ^b	<0,001
Albuminúria (mg/L)	7,40 (2,99-12,30) ^a	11,70 (4,65-19,95) ^a	98,70 (61,30-209,97) ^b	618,15 (200,15-1854,7) ^b	<0,001
Creatinina sérica (mg/dL)	0,69 (0,58-0,87) ^a	0,73 (0,60-0,95) ^a	0,72 (0,55-0,84) ^a	2,51 (2,02-3,29) ^b	<0,001
Glicemia em jejum (mg/dL)	90,0 (83,0-94,0) ^a	140,0 (113,75-169,50) ^b	162,0 (88,25-191,25) ^b	126,0 (73,0-171,5) ^b	<0,001
HbA1c (%)	5,5 (5,3-5,7) ^a	7,85 (7,0-9,12) ^b	8,7 (7,6-9,4) ^b	7,9 (7,2-9,4) ^b	<0,001
Colesterol Total (mg/dL)	200,28 ± 33,08	179,15 ± 48,28	179,40 ± 40,52	181,73 ± 53,03	0,413
Colesterol-HDL (mg/dL)	45,67 ± 8,97 ^a	40,65 ± 7,71 ^a	38,75 ± 11,0 ^a	36,5 ± 10,48 ^b	0,026
Colesterol-LDL (mg/dL)	125,8 (101,95-144,3) ^a	97,7 (72,4-136,1) ^{ab}	94,0 (84,85-99,9) ^b	89,0 (72,0-122,5) ^b	0,008
Triglicerídeos (mg/dL)	126,56 ± 51,55 ^a	156,69 ± 69,78 ^{ab}	253,05 ± 213,10 ^b	255,64 ± 177,42 ^b	0,007
PCRus (mg/dL)	3,06 (1,72-9,29)	3,44 (1,36-8,01)	2,66 (1,75-4,28)	4,54 (1,81-17,52)	0,262
IL-6 (pg/dL)	3,12 (3,12-3,18) ^a	3,12 (3,12-3,5) ^a	3,12 (3,12-4,06) ^a	7,03 (3,94-9,66) ^b	<0,001
IMC (kg/m ²)	28,2 (25,5-33,0)	30,0 (26,3-32,8)	31,7 (27,7-38,1)	30,9 (28,0-38,5)	0,078
Gordura corporal (%)	37,1 (29,5-43,5)	34,8 (28,0-42,7)	38,35 (23,7-46,1)	38,25 (27,9-47,2)	0,700
FAM (kg/f)	20,5 (15,75-33,25)	24,5 (14,75-32,0)	19,75 (14,75-38,0)	19,0 (10,0-28,25)	0,374

Dados expressos em n (%), média ± DP ou mediana e intervalo interquartil (P25 – P75). Letras diferentes indicam p <0,05. DM2: diabetes mellitus tipo 2; FAM: força do aperto de mão; HbA1c: hemoglobina glicada; IL-6: interleucina-6; IMC: índice de massa corporal; PCRus: proteína C-reativa ultrasensível; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada.

FIGURA 1

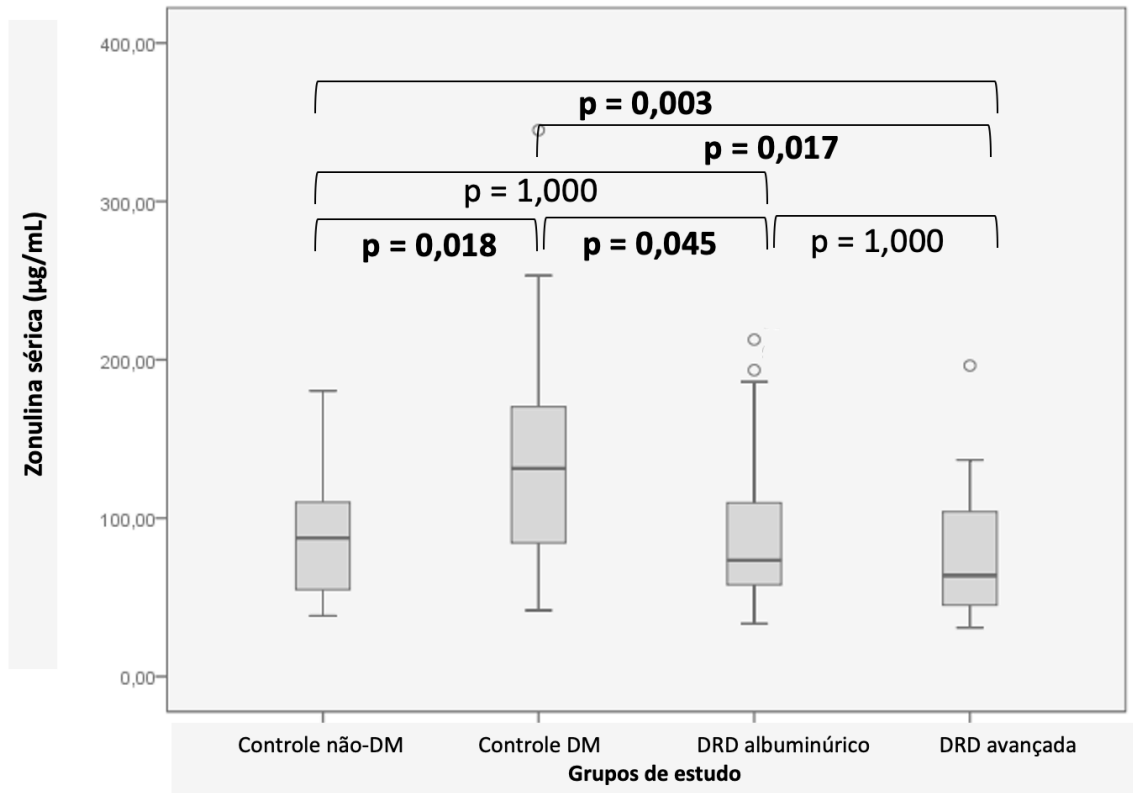


Figura 1: Níveis séricos de zonulina, em mediana, nos diferentes grupos de estudo.

Valores em negrito indicam $p < 0,05$.

DM: diabetes mellitus; DRD: doença renal do diabetes.

Tabela 2: Correlações entre zonulina sérica e parâmetros renais, glicêmicos, lipídicos, inflamatórios e de composição corporal, com e sem o grupo controle não-DM2.

	r (p) N = 86
TFGe (ml/min/1,73 m ²)	0,222 (0,040)
Proteinúria (mg/L)	-0,214 (0,048)
Creatinina (mg/dL)	-0,171 (0,116)
Albuminúria (mg/L)	-0,243 (0,024)
Duração DM (anos)	-0,239 (0,049)
Glicemia em jejum (mg/dL)	0,136 (0,211)
HbA1c (%)	0,045 (0,681)
HOMA-IR	-0,018 (0,873)
Colesterol Total (mg/dL)	0,229 (0,034)
Colesterol-HDL (mg/dL)	-0,117 (0,285)
Colesterol-LDL (mg/dL)	0,258 (0,021)
Triglicerídeos (mg/dL)	0,102 (0,384)
IL-6 (pg/mL)	-0,180 (0,099)
PCRus (mg/dL)	-0,135 (0,220)
IMC (kg/m ²)	-0,198 (0,067)
Gordura corporal (%)	-0,271 (0,014)
Massa magra (kg)	0,182 (0,102)
Massa livre de gordura	0,178 (0,109)
Água corporal total (kg)	0,173 (0,121)
FAM (kg/f)	0,276 (0,011)

Tabela 3. Associação entre zonulina (log) e desfechos renais, cardiovasculares e óbito.

Pacientes (n=66)	Zonulina	p
Desfechos renais		0,007
Sim (n = 30)	4,27 ± 0,50	
Não	4,64 ± 0,57	
Desfechos cardiovasculares		0,204
Sim (n = 16)	4,31 ± 0,47	
Não	4,52 ± 0,59	
Óbito		0,060
Sim (n = 9)	4,13 ± 0,40	
Não	4,52 ± 0,58	

Valores expressos em média ± desvio padrão

Tabela 4: Análise multivariada entre presença de desfecho e zonulina e comorbidades por Regressão de Poisson.

Variável	RP (IC 95%) bruta	p	RP ajustada (IC95%)	p
Zonulina				
1 tercil	2,35 (1,06; 5,22)	0,035	2,36 (1,06; 5,26)	0,035
2 tercil	2,51 (1,16; 5,68)	0,020	2,76 (1,24; 6,15)	0,013
3 tercil	1,0	-	1,0	-
HAS				
Sim	1,74 (0,35; 8,75)	0,500	0,455 (0,03; 6,61)	0,564
Não	1,0	-	1,0	-
DM				
Sim	2,36 (0,48; 13,05)	0,325	2,40 (0,14; 41,38)	0,546
Não	1,0	-	1,0	-
DSLPP				
Sim	2,06 (0,89; 4,78)	0,092	1,70 (0,62; 4,63)	0,301
Não	1,0	-	1,0	-
Fumo				
Sim	1,21 (0,79; 1,86)	0,374	1,32 (0,87; 2,01)	0,193
Não	1,0	-	1,0	-
Obesidade				
Sim	0,90 (0,59; 1,38)	0,642	0,89 (0,59; 1,34)	0,588
Não	1,0	-	1,0	-
Idade (anos)	1,00 (0,98; 1,03)	0,518	0,99 (0,97; 1,01)	0,564

*Ajustado para tercis de zonulina, HAS, DM, DSLPP, fumo, obesidade e idade. DM: diabetes mellitus; DSLPP: dislipidemia; HAS: hipertensão arterial sistêmica.

REFERÊNCIAS

- [1] Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res* 2017;120:1183–96. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.
- [2] Mafra D, Lobo JC, Barros AF, Koppe L, Vaziri ND, Fouque D. Role of altered intestinal microbiota in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Future Microbiol* 2014;9:399–410. doi:10.2217/fmb.13.165.
- [3] Castillo-Rodriguez E, Fernandez-Prado R, Esteras R, Perez-Gomez MV, Gracia-Iguacel C, Fernandez-Fernandez B, et al. Impact of altered intestinal microbiota on chronic kidney disease progression. vol. 10. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2018. doi:10.3390/toxins10070300.
- [4] Wong J, Piceno YM, DeSantis TZ, Pahl M, Andersen GL, Vaziri ND. Expansion of Urease- and Uricase-Containing, Indole- and p-Cresol-Forming and Contraction of Short-Chain Fatty Acid-Producing Intestinal Microbiota in ESRD. *Am J Nephrol* 2014;39:230–7. doi:10.1159/000360010.
- [5] Nallu A, Sharma S, Ramezani A, Muralidharan J, Raj D. Gut microbiome in chronic kidney disease: challenges and opportunities. *Transl Res* 2017;179:24–37. doi:10.1016/j.trsl.2016.04.007.
- [6] Borges NA, Barros AF, Nakao LS, Dolenga CJ, Fouque D, Mafra D. Protein-Bound Uremic Toxins from Gut Microbiota and Inflammatory Markers in Chronic Kidney Disease. *J Ren Nutr* 2016;26:396–400. doi:10.1053/j.jrn.2016.07.005.
- [7] Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev* 2010;90:859–904. doi:10.1152/physrev.00045.2009.
- [8] Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;11:821–34. doi:10.1080/17474124.2017.1343143.
- [9] Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000;355:1518–9. doi:10.1016/S0140-6736(00)02169-3.
- [10] Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers* 2016;4:e1251384. doi:10.1080/21688370.2016.1251384.
- [11] Fasano A. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Physiol Rev* 2011;91:151–75. doi:10.1152/physrev.00003.2008.
- [12] KDIGO. Chapter 3: Management of progression and complications of CKD. *Kidney Int Suppl* 2013;3:73–90. doi:10.1038/kisup.2012.66.
- [13] Zhang D, Zhang L, Zheng Y, Yue F, Russell RD, Zeng Y. Circulating zonulin levels in newly diagnosed Chinese type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;106:312–8. doi:10.1016/j.diabres.2014.08.017.
- [14] Lukaszuk E, Lukaszuk M, Koc-Zorawska E, Bodzenta-Lukaszuk A, Malyszko J. Zonulin, inflammation and iron status in patients with early stages of chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol* 2017;50:121–5. doi:10.1007/s11255-017-1741-5.
- [15] Nicoletto BB, Krolikowski TC, Crispim D, Canani LH. Serum and urinary progranulin in diabetic kidney disease. *PLoS One* 2016;11:e0165177.

- doi:10.1371/journal.pone.0165177.
- [16] American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2017;40:S11–24. doi:10.2337/dc17-S005.
 - [17] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604. doi:10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.
 - [18] Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM, et al. Bioelectrical impedance analysis - Part II: Utilization in clinical practice. *Clin Nutr* 2004;23:1430–53. doi:10.1016/j.clnu.2004.09.012.
 - [19] Schlüssel MM, dos Anjos LA, de Vasconcellos MTL, Kac G. Reference values of handgrip dynamometry of healthy adults: A population-based study. *Clin Nutr* 2008. doi:10.1016/j.clnu.2008.04.004.
 - [20] Ficek J, Wyskida K, Ficek R, Wajda J, Klein D, Witkowicz J, et al. Relationship between plasma levels of zonulin, bacterial lipopolysaccharides, d-lactate and markers of inflammation in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2017;49:717–25. doi:10.1007/s11255-016-1495-5.
 - [21] Demir E, Ozkan H, Seckin KD, Sahtiyancı B, Demir B, Tabak O, et al. Plasma zonulin levels as a non-invasive biomarker of intestinal permeability in women with gestational diabetes mellitus. *Biomolecules* 2019. doi:10.3390/biom9010024.
 - [22] Hasslacher C, Kulozik F, Platten I, Kraft M, Siegel E. Serum zonulin as parameter of intestinal permeability in longstanding type 2 diabetes: correlations with metabolism parameter and renal function. *J Diabetes, Metab Disord Control* 2018;5:58–62. doi:10.15406/jdmdc.2018.05.00138.
 - [23] Carnevale R, Pastori D, Nocella C, Cammisotto V, Baratta F, Del Ben M, et al. Low-grade endotoxemia, gut permeability and platelet activation in patients with impaired fasting glucose. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2017;27:890–5. doi:10.1016/j.numecd.2017.06.007.
 - [24] Karatas A, Cihan M, Dugeroglu H, Kaya Y, Bayrak T, Canakci E. The relation of zonulin level to inflammation and metabolic conditions in patients with chronic kidney disease. *Acta Medica Mediterr* 2019. doi:10.19193/0393-6384_2019_2_162.
 - [25] Malyszko J, Koc-Zorawska E, Levin-Iaina N, Malyszko J. Zonulin, iron status, and anemia in kidney transplant recipients: Are they related? *Transplant Proc* 2014;46:2644–6. doi:10.1016/j.transproceed.2014.09.018.
 - [26] Al-Obaide MAI, Singh R, Datta P, Rewers-Felkins KA, Salguero M V., Al-Obaidi I, et al. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine-N-oxide and Serum Biomarkers in Patients with T2DM and Advanced CKD. *J Clin Med* 2017;6:86. doi:10.3390/jcm6090086.
 - [27] Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ortega F, Ricart W, Fernández-Real JM. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PLoS One* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0037160.
 - [28] Dschietzig TB, Boschann F, Ruppert J, Armbruster FP, Meinitzer A, Bankovic D, et al. Plasma Zonulin and its Association with Kidney Function, Severity of Heart Failure, and Metabolic Inflammation. *Clin Lab* 2016;62:2443–7. doi:10.7754/Clin.Lab.2016.160512.
 - [29] Terpstra ML, Singh R, Geerlings SE, Bemelman FJ. Measurement of the intestinal permeability in chronic kidney disease. *World J Nephrol* 2016.

- doi:10.5527/wjn.v5.i4.378.
- [30] Ohlsson B. An Okinawan-based Nordic diet improves glucose and lipid metabolism in health and type 2 diabetes, in alignment with changes in the endocrine profile, whereas zonulin levels are elevated (Review). *Exp Ther Med* 2019;2883–93. doi:10.3892/etm.2019.7303.
- [31] Hunt PW, Sinclair E, Rodriguez B, Shive C, Clagett B, Funderburg N, et al. Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection. *J Infect Dis* 2014;210:1228–38. doi:10.1093/infdis/jiu238.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram a importância de avaliar a permeabilidade intestinal em doenças crônicas, tendo em vista a complexa fisiopatologia acerca do diabetes mellitus e da doença renal. Diversos fatores influenciam na saúde intestinal e na DRD, porém não se sabe ao certo o que é causa e consequência: o acometimento da microbiota e do intestino ou os elevados níveis de glicose com reduzida função renal. Sugere-se que ambos compartilham vias fisiopatológicas semelhantes, tais como o sistema imunológico.

Embora o estudo atual tenha demonstrado algumas contradições em relação ao encontrado na literatura, os dados sugerem que o aumento de zonulina em pacientes controle DM pode ser indicativo de lesão na barreira intestinal, mesmo sem ter apresentado correlações significativas com parâmetros glicêmicos.

Os dados mostram a escassez de informações referentes aos marcadores de permeabilidade intestinal na doença renal. Sendo assim, é de extrema importância que sejam avaliados novos marcadores que incluam essa população. Por fim, a identificação dos fatores de risco de uma permeabilidade intestinal prejudicada pode ser incluída nas rotinas dos profissionais de saúde, a partir de novos estudos com alvos terapêuticos.