

U. PORTO



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Relação entre o microbioma intestinal e a patologia metabólica

Relationship between intestinal microbioma and metabolic pathology

Inês Vasconcellos Porto Sarmento de Beires

Orientado por: Dr^a Natália Costa

Coorientado por: Prof. Dr. Alejandro Santos

Tipo de documento: Monografia

Ciclo de estudos: 1.º Ciclo em Ciências da Nutrição

Instituição académica: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da

Universidade do Porto

Porto, 2017

Resumo

O microbioma intestinal está relacionado com diversos processos metabólicos, que interferem com a saúde do hospedeiro, sendo por isso cada vez mais importante a compreensão desses processos. A fermentação de hidratos de carbono não digeríveis é um dos processos com participação ativa do microbioma e conduz à formação de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC). Os AGCC podem também ser formados a partir de aminoácidos e têm um papel importante de manutenção das funções da barreira microbiana e são uma fonte de energia das próprias bactérias e dos colonócitos. A obesidade e a diabetes mellitus tipo 2 são duas patologias associadas ao metabolismo e influenciadas pelo microbioma intestinal. A dieta é também um fator determinante da constituição e diversidade do microbioma intestinal. Dietas ricas em gordura e pobres em fibra levam a menor diversidade no microbioma intestinal quando comparadas com dietas pobres em gordura e ricas em fibra. A compreensão dos processos metabólicos levados a cabo pelo microbioma o nos quais este interfere permite uma atuação de prevenção ou melhoria das referidas patologias. Alguns dos tratamentos possíveis são o transplante fecal, a utilização de probióticos e de prebióticos e a utilização de associações de microorganismos pré-organizadas que fortalecem a rede microbiana intestinal que suporta a saúde humana (*intestinal microbial network units*).

Abstract

The intestinal microbiome is related to several metabolic processes, which interfere with a host's health, being therefore increasingly important to understand those processes. A non-digestible carbohydrate fermentation is one of the processes with microbioma participation and induces short chain fatty acid (SCFA) formation. SCFAs can also be formed from amino acids and have an important role in

maintaining the functions of the microbial barrier and are a source of energy for bacteria and colonocytes themselves. Obesity and type 2 diabetes are two pathologies associated with metabolism and influenced by the intestinal microbiome. Diet is also a determinant of the constitution and diversity of the intestinal microbiome. Fat-rich and fiber-poor diets lead to less diversity in the intestinal microbiome when compared to low-fat and fiber-rich diets. An understanding of the metabolic processes carried out by the microbiome or in which it interferes allows an update of prevention or improvement of pathologies. Some of the possible treatments are fecal transplantation, a use of probiotics and pre-antibiotics and a use of associations of preorganized microorganisms that strengthen the intestinal microbial network that supports human health (intestinal microbial network units).

Palavras-Chave em Português

“Microbioma gastrointestinal”; “Patologia metabólica”; “Obesidade”; “Síndrome metabólico”; “Diabetes tipo 2”

Palavras-Chave em Inglês

“Gastronintestinal microbiome”; “Metabolic diseases”; “Obesity”; “Metabolic syndrome”; “Type 2 diabetes”

Índice

| | |
|---|-----|
| Resumo e abstract | i |
| Palavras-Chave em Português e Inglês | iii |
| Introdução | 1 |
| Objetivos | 3 |
| Metodologia de Pesquisa Bibliográfica..... | 3 |
| Papel do microbioma no metabolismo dos hidratos de carbono não digeríveis.. | 4 |
| Microbioma intestinal, ácidos biliares e regulação metabólica..... | 6 |
| Microbioma intestinal, inflamação e regulação metabólica..... | 7 |
| Papel do microbioma intestinal no metabolismo de aminoácidos e seus derivados e saúde..... | 7 |
| Modulação da composição do microbioma intestinal e saúde..... | 9 |
| Análise crítica e conclusões | 15 |
| Referências Bibliográficas | 16 |

Introdução

O microbioma intestinal compreende um conjunto de espécies de microrganismos que habitam o tracto gastrointestinal⁽¹⁾ e que a partir da fermentação de hidratos de carbono não digeridos e consequente absorção de ácidos gordos de cadeia curta, fazem uma recuperação de energia para o seu hospedeiro, contribuindo para a sua eficiência metabólica.⁽²⁾ Dos ácidos gordos de cadeia curta, os mais importantes de referir são o butirato, o propionato e o acetato. O butirato é metabolizado no cólon, o propionato no fígado e o acetato no músculo. O microbioma intestinal humano abrange os domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*⁽³⁾ e cinco filos predominantes, nomeadamente *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*.⁽³⁾ A grande maioria da população bacteriana corresponde a espécies gram-negativas anaeróbicas obrigatórias, predominando os géneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* e *Fusobacterium*.

O excesso de peso e a obesidade são determinantes importantes no desenvolvimento de algumas doenças crónicas, tais como a diabetes, doenças cardiovasculares e cancro. Segundo a WHO, em 2014 mais de 1.9 biliões de adultos (considerados a partir dos 18 anos, inclusive) tinham excesso de peso, e deste número mais de 600 milhões eram obesos. Isto significa que os adultos com excesso de peso representavam 39% da população e os adultos obesos 13%. Estes dados alarmantes conduzem a um interesse cada vez maior em estudar todos os fatores que podem influenciar as doenças metabólicas, sendo que o excesso de peso e a obesidade e, conseqüentemente, a diabetes tipo 2 representam uma grande fatia das mesmas. O excesso de peso e a obesidade devem-se a uma acumulação excessiva e/ou anormal de gordura, sendo um risco

para a saúde do indivíduo. Já a diabetes tipo 2 é devida à incapacidade do organismo de usar corretamente a insulina e resulta frequentemente do excesso de peso e da falta de atividade física.

Uma vez que o microbioma intestinal humano é responsável pela formação de ácidos gordos de cadeia curta, permitindo a sua absorção pelo organismo, percebemos que é um forte determinante do metabolismo. São fatores responsáveis pelas diferenças entre o microbioma de diferentes indivíduos o genótipo, a fisiologia, as patologias, o estilo de vida, a dieta e o ambiente. Alterações em alguns destes parâmetros podem também induzir alterações no microbioma intestinal do próprio hospedeiro. Além disso, as bactérias constituintes do microbioma encontram-se num local entre a ingestão de nutrientes e a sua absorção e secreção, podendo interferir nestas duas etapas, influenciando também o metabolismo do seu hospedeiro.⁽¹⁾ O microbioma intestinal humano é constituído por uma grande variedade de bactérias e, para além desta diversidade, as bactérias constituintes deste órgão ainda variam de indivíduo para indivíduo, quase como uma impressão digital. Esta variabilidade torna difícil determinar qual será uma normal constituição do microbioma. Ainda assim, sabemos que é composto essencialmente por microrganismos do filo *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, indicando uma seleção do próprio habitat. Apesar desta variação inter-individual nos membros do microbioma, há um conjunto de genes comuns que garantem que certas funções fundamentais sejam realizadas, nomeadamente a degradação de polissacarídeos complexos e a síntese de ácidos gordos de cadeia curta, aminoácidos e vitaminas.⁽⁴⁾ Quando ocorre um desequilíbrio nos microrganismos intestinais não se conseguindo a prevalência dos microrganismos benéficos para o hospedeiro sobre aqueles que não o são, há uma proliferação destes últimos, podendo também

ocorrer um aumento do fluxo de vias metabólicas prejudiciais. Esta situação denomina-se disbiose. A disbiose pode conduzir a várias patologias.

Objetivos

Com este estudo pretende-se compreender a relação existente entre o microbioma intestinal e a patologia metabólica, nomeadamente, a influência que o primeiro poderá ter sobre a segunda, tentando através de uma análise bioquímica do tema perceber onde podemos atuar e se a dieta será uma intervenção suficiente.

Metodologia de Pesquisa Bibliográfica

Para a realização deste estudo recorreu-se à base de pesquisa da Pubmed, onde foram pesquisados artigos com as expressões “Gut microbiota and metabolic pathology”, “Intestinal microbiome and metabolic pathology”, “Gut microbiota and metabolic disease”, “Gut microbiota and healthy”, “Diet and gut microbiota” e “Intestinal microbiome and metabolic disease” e com os termos MeSH “Gastronintestinal Microbiome”; “Metabolic Diseases”; “Obesity”; “Metabolic Syndrome”; “Type 2 Diabetes”. Após a pesquisa, os artigos foram selecionados com base na sua relação ao tema deste estudo, através da leitura dos seus resumos. Posteriormente, foi verificada a data de publicação de cada artigo e o facto de os estudos serem feitos em humanos ou animais. Por impossibilidade de realização de alguns estudos em humanos, neste trabalho foram também tidos em conta artigos referentes a estudos em animais. Terminada a triagem dos artigos encontrados, os artigos selecionados foram estudados e analisados, assim como as respectivas referências.

Papel do microbioma no metabolismo dos hidratos de carbono não digeríveis

A partir dos hidratos de carbono não digeríveis provenientes da dieta, o microbioma intestinal, através da fermentação, origina ácidos gordos de cadeia curta, sendo os mais relevantes de referir o propionato, o acetato e o butirato. A formação de propionato pode ocorrer de três formas diferentes: (i) o piruvato originado pela glicólise é convertido a lactato na fermentação láctica, que leva à formação de propionato pela atividade da desidratase da lactol-CoA, (ii) o oxaloacetato é originado pelo piruvato e o succinato é utilizado como substrato, ocorrendo a descarboxilação do metilmalonil-CoA a propionil-CoA, (iii) a conversão do propionaldeído a propionil-CoA pela desidrogenase do propionaldeído dependente da CoA, através do propanediol origina propionato. A via (i) é realizada apenas por determinados membros das famílias *Veillonellaceae* (*Negativicutes*, *Firmicutes*) e *Lachnospiraceae* (*Clostridia*, *Firmicutes*),⁽⁵⁾ a via (ii) por diversos membros da classe *Negativicutes* (filo *Firmicutes*) e *Bacteroidetes* e a via (iii) encontra-se em bactérias como as proteobacterias e pertencentes à família *Lachnospiraceae*.^(6, 7)

Um estudo encontrou uma relação entre a abundância de *Bacteroidetes* e a concentração fecal de propionato, permitindo deduzir que a via mais comum na síntese de propionato é a (ii).⁽⁸⁾ O formato e o acetil-CoA originados pelo piruvato participam na formação do acetato. Por sua vez o acetato, juntamente com o butiril-CoA numa única reação enzimática originam butirato. Apesar de ser esta a via de produção de ácido butírico utilizada pela maioria das bactérias do microbioma intestinal humano,⁽⁹⁾ como algumas dos géneros *Faecalibacterium* (*Firmicutes*), *Eubacterium* (*Firmicutes*) e *Roseburia* (*Firmicutes*),⁽⁶⁾ uma outra via existe para a formação deste ácido gordo de cadeia curta que envolve as enzimas

fosfotransbutirilase e cínase do butirato para a partir do butiril-CoA originar butirato.⁽¹⁰⁾ Esta última via apenas é realizada por algumas espécies de *Coprococcus* (*Lachnospiraceae*, *Clostridia*, *Firmicutes*).⁽⁵⁾ Para além disso, as espécies *Roseburia inulinivorans* e *Coprococcus catus* têm a capacidade de produzir tanto o ácido propiónico como o ácido butírico.⁽⁶⁾ Um estudo mostrou que uma dieta pobre em hidratos de carbono em humanos com obesidade leva à diminuição da produção de ácidos gordos de cadeia curta, sendo essa diminuição causada pelo butirato, devido a uma redução no número de bactérias produtoras deste ácido gordo de cadeia curta (*Roseburia spp.* e *Eubacterium rectale*), uma vez que a produção de acetato aumentou ligeiramente e a de propionato não tem alterações significativas. Assim, a produção de butirato é determinada pelos hidratos de carbono fermentáveis presentes na dieta.⁽¹¹⁾ Apesar da formação de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) se iniciar na fermentação de hidratos de carbono, aminoácidos como a valina, leucina e isoleucina podem originar isobutirato, isovalerato and 2-metil butirato, que correspondem a 5% do total da produção de AGCC.⁽¹²⁾ Os referidos AGCC têm um papel importante de manutenção das funções da barreira microbiana e, além disso, são uma fonte de energia das próprias bactérias e dos colonócitos.⁽¹²⁾

O género *Bacteroides* abrange muitas espécies com genes responsáveis por codificar as *carbohydrate-active enzymes* (CAZyme) em maior número e variedade que microrganismos de outros locais do corpo. As CAZyme são responsáveis pela associação de hidratos de carbono (glicosiltransferases) e pelo seu catabolismo (glicosilhidrolases e líases polissacarídicas).⁽¹³⁾ Este catabolismo liberta os AGCC referidos anteriormente.⁽¹⁴⁾ O butirato participa como regulador na diferenciação das células T reguladoras do cólon e, por isso, tem influência nas respostas inflamatória

e alérgica.⁽¹⁵⁾ Microrganismos produtores de butirato promovem a saúde do intestino.⁽¹⁶⁾ Percebemos, assim, a grande importância do microbioma intestinal no metabolismo dos hidratos de carbono da dieta. Além disso, o microbioma pode contribuir para a variação dos lípidos no organismo do seu hospedeiro, independentemente da idade, género, IMC e genótipo do mesmo.⁽¹⁷⁾

Microbioma intestinal, ácidos biliares e regulação metabólica

Os ácidos biliares atuam diretamente sobre as gorduras com a função de detergente, permitindo que as enzimas reajam com as mesmas, originando ácidos gordos e colesterol. O microbioma intestinal participa na conversão de ácidos biliares primários em secundários e estes ácidos são sinalizadores de moléculas em vias metabólicas.⁽¹⁸⁾ Além do referido, o microbioma atua regulando o TGR5, um recetor acoplado à proteína G específico para ácidos biliares.⁽¹⁹⁾ A administração de um agonista do TGR5 em ratos alimentados por uma dieta rica em gordura levou a uma diminuição dos níveis de glicose e insulina no sangue e melhorou a tolerância à glicose.⁽²⁰⁾ Os recetores acoplados da proteína G, nomeadamente o GPR41 e o GPR43 influenciam a regulação enteroendócrina e são ativados pelos AGCC pois são recetores dos mesmos.^(21, 22) O GPR43 é essencialmente ativado pelo acetato e pelo propionato enquanto o GPR41 é mais frequentemente ativado pelo propionato e pelo butirato. A interação do microbioma com AGCC e ácidos biliares e os seus recetores presentes nas células L enteroendócrinas (GPR41, GPR43 e TGR5) contribui para a regulação da secreção da hormona incretina.⁽²³⁻²⁵⁾ As células L enteroendócrinas quando estimuladas libertam GLP-1 (glucagon-like peptide-1), GLP-2 (glucagon-like peptide-2) e PYY (peptídeo YY), que vão estimular a libertação de insulina e, portanto, a diminuição dos níveis de glicose no sangue.⁽²⁶⁾ Este processo contribui para uma maior

sensibilidade à insulina e diminuição de hiperglicemias, sendo preventivo de patologias metabólicas como a diabetes tipo 2 e mesmo a obesidade. As vias de sinalização ácido biliar-TGR5-AMPc melhoram o gasto energético pelo tecido adiposo.^(20, 27) Através do aumento da captação de colesterol para a síntese de novo de ácidos biliares, os AGCC podem diminuir o risco de desenvolvimento de patologias metabólicas.⁽²⁸⁾

Microbioma intestinal, inflamação e regulação metabólica

O lipopolissacarídeo ou lipoglicano ou LPS é uma molécula constituída por um lípido e um polissacarídeo ligados covalentemente e é um dos principais constituintes da membrana exterior de bactérias gram-negativas, sendo uma das suas funções a proteção da membrana bacteriana a nível químico. Uma das suas particularidades é o facto de fazer parecer semelhantes diversas bactérias nas quais está presente, impedindo assim ataques específicos a determinada bactéria. O LPS é uma endotoxina que induz respostas imunitárias, através do contacto com macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B, nomeadamente, conduz a uma resposta inflamatória com febre, vasodilatação e secreção de eicosanóides.⁽²⁹⁾ Assim sendo, o LPS, através da ligação ao *toll-like receptor-4* (TLR4) nas células endoteliais, pode ser um fator determinante no desenvolvimento de doenças crónicas contribuindo, por exemplo, para a resistência à ação da insulina. Estudos mostraram que uma dieta rica em gordura conduz à passagem desta endotoxina para o sistema circulatório por difusão direta ou por absorção pelos enterócitos.⁽³⁰⁾

Papel do microbioma intestinal no metabolismo de aminoácidos e seus derivados e saúde

O N-óxido de trimetilamina (TMAO) é um metabolito que deriva da colina e carnitina da dieta, através da ação dos microrganismos do microbioma na oxidação de

trimetilamina, e tem uma função importante em diversas patologias cardiometabólicas, sendo que níveis aumentados do referido metabolito se correlacionam positivamente com essas patologias.⁽³¹⁾ Um estudo mostrou uma correlação negativa entre o TMAO e a abundância de *Faecalibacterium prausnitzii* (*Clostridia*, *Firmicutes*) no microbioma.⁽³²⁾ Um baixo número de bactérias desta espécie foi relacionado com obesidade, diabetes e várias doenças imunes.^(33, 34) Podemos constatar que esta espécie tem efeito anti-inflamatório, e, assim, uma disbiose está associada a diversas patologias. Foram encontradas fortes associações entre o microbioma e os níveis de glutamina, onde os *Clostridiales* estavam correlacionados positivamente com o aumento das concentrações do referido aminoácido.⁽³²⁾ Um estudo mostrou que após um tempo curto de suplementação com L-glutamina, um grupo de pessoas com excesso de peso e obesidade apresentavam alterações nos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria*, em comparação com o grupo de pessoas com excesso de peso e obesidade suplementado com L-alanina. Além disso, a razão *Firmicutes:Bacteroidetes* diminui no primeiro grupo referido e aumenta no segundo grupo. Os gêneros do filo *Firmicutes* que mais contribuíram para a diminuição no primeiro grupo foram *Dialister*, *Dorea*, *Pseudobutyrvibrio* e *Veillonella*. Assim, a suplementação com L-glutamina melhora a tolerância à glicose, tendo consequências no desenvolvimento de obesidade e diabetes mellitus do tipo 2.⁽³⁵⁾ Concentrações elevadas de glutamina e reduzidas de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) estão associadas a indivíduos com baixo Índice de Massa Corporal (IMC) e o oposto verifica-se em indivíduos com patologia metabólica. Maior abundância de *Methanobrevibacter* de *Archaea*, *Tenericutes*, *Peptococcaceae* e *Christensenellaceae* está associada a concentrações mais baixas de triacilglicerídeos. Não foram encontradas associações significativas

relativamente às High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein LDL e IMC. Existe associação entre a abundância de *Peptococcaceae* e *Prevotella* e o TMAO.⁽³²⁾ Um estudo em humanos mostrou que passar de uma dieta rica em gordura e pobre em fibra para uma dieta pobre em gordura e rica em fibra altera a composição do microbioma em 24h.⁽³⁶⁾ Os gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e um não identificado da família *Ruminococcaceae* são os que mais contribuem para a diversidade do microbioma intestinal. O acetato é o maior contribuidor para a variação da diversidade microbiana, que está relacionada positivamente com os níveis de glutamina, hemoglobina glicosada e níveis de acetato.⁽³²⁾

Modulação da composição do microbioma intestinal e saúde

O tipo de dieta a longo prazo e a fisiologia e genética do hospedeiro afetam a estrutura e as funções do microbioma intestinal,^(37, 38) sendo que a dieta, a longo prazo, é um fator crítico na determinação da composição do microbioma intestinal.⁽³⁹⁾ Uma dieta rica em plantas leva ao predomínio do filo *Bacteroidetes* no microbioma intestinal.⁽⁴⁰⁾ Uma dieta rica em fibra e pobre em gordura providencia um microbioma intestinal com maior diversidade e diferente daquele que é derivado de dietas pobres em fibra e ricas em gordura.⁽⁴¹⁾ Uma vez que a menor diversidade microbiana intestinal está associada a maior adiposidade geral, maior resistência à insulina, dislipidemia e a maior inflamação quando comparada com uma maior diversidade do microbioma⁽⁴²⁾, uma dieta rica em fibra e pobre em gordura pode ter influência na proteção do hospedeiro contra os referidos parâmetros. No entanto, no que diz respeito à inflamação, apesar da melhoria a que a dieta pode conduzir em fenótipos de baixa diversidade microbiótica, esta parece não ser tão eficiente como nos restantes parâmetros verificados.⁽⁴³⁾ Diversos estudos observaram uma razão *Firmicutes:Bacteroidetes* superior em humanos obesos quando comparados

com humanos magros.⁽⁴⁴⁾ No entanto, foram também realizados estudos em que esta situação não se verificou.^(45, 46) Uma dieta rica em gordura interfere com o microbioma e leva a uma resposta pró-inflamatória,^(47, 48) sendo que está associada à obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólico.⁽⁴⁹⁾ A obesidade ou dietas ricas em gordura alteram o microbioma, aumentando a permeabilidade da barreira microbiótica, levando à passagem de produtos bacterianos e das próprias bactérias para a circulação, o que pode originar uma inflamação com formação de produtos metabólicos bioativos relacionada com a resistência à insulina.^(50, 51)

A abundância do gênero *Blautia* está correlacionada positivamente com os níveis de ácidos gordos saturados e monoinsaturados e negativamente com o grau de insaturação e os ácidos gordos polinsaturados. O oposto das correlações acabadas de referir verificou-se para o filo *Tenericutes*, a família *Peptococcaceae* (filo *Firmicutes*) e o gênero *Bacteroides* (filo *Bacteroidetes*).⁽³²⁾ Os níveis de glicose em jejum estão associados a um gênero não identificado da família *Coriobacteriaceae* e o gênero *Blautia* está correlacionado positivamente com o piruvato e o glicerol. A família *Coriobacteriaceae* está em falta em pessoas com diabetes e deficiente tolerância à glicose,⁽⁵²⁾ o que permite constatar que estas bactérias podem afetar de forma relevante o metabolismo glicídico.

Um estudo com um modulador do microbioma intestinal (inulina, beta-glucano de aveia e antocianinas e polifenóis de mirtilo) administrado como suplemento melhorou a tolerância à glicose, causou alterações nos marcadores fecais, diminuiu o pH das fezes e aumentou a sensação de saciedade e a flatulência. A diminuição do pH e o aumento da flatulência são indicadores de fermentação. Além disto, os níveis de glicose sanguínea aumentaram menos nas pessoas que tomaram o suplemento do que no grupo placebo. Apesar de ter ocorrido um aumento nas

concentrações plasmáticas do PYY e uma diminuição nas concentrações plasmáticas de grelina, devido à grande variabilidade dos dados, estes resultados não foram significativos.⁽⁵³⁾ O PYY reduz o esvaziamento gástrico através da indução de sinais de saciedade no cérebro. Da mesma forma, a grelina induz a ativação das vias orexigénicas com expressão do neuropeptídeo Y.⁽⁵⁴⁾ Forma-se uma massa viscosa no trato gastrointestinal, o esvaziamento gástrico atrasa-se e, conseqüentemente, o trânsito intestinal também, ocorre distensão do estômago e a absorção de nutrientes é lenta.⁽⁵⁵⁾ Todos estes aspetos conduzem à sensação de satisfação e saciedade, diminuindo a vontade de ingestão de alimentos. Em indivíduos com excesso de peso e obesos com níveis de glicose em jejum fora dos limites normais, a toma do referido suplemento melhorou a glicemia pós-prandial.⁽⁵³⁾ O microbioma intestinal interfere no desenvolvimento de diversas patologias metabólicas, assim, torna-se importante encontrar formas de pela sua modificação conseguir prevenir ou tratar estas doenças. Atualmente existem diversos tratamentos, nomeadamente o transplante fecal, o uso de probióticos e prebióticos e de associações de microorganismos pré-organizadas que fortalecem a rede microbiana intestinal que suporta a saúde humana (*intestinal microbial network units*). O transplante fecal consiste na introdução pelas vias nasal, oral ou anal de fezes de outro indivíduo com a constituição do microbioma pretendido. Os microrganismos inseridos neste transplante competem com os já existentes no indivíduo recetor, quer por alimento quer por habitat, recolonizando o intestino do hospedeiro, proporcionando-lhe um novo microbioma. Vários estudos foram feitos para averiguar a eficácia deste método e verificou-se que efetivamente ocorrem várias alterações na composição do microbioma de indivíduos com diabetes tipo 2, assim como nos processos metabólicos levados a cabo por estes

microrganismos.⁽⁵⁶⁾ Em indivíduos com síndrome metabólica há uma maior produção e absorção de ácidos gordos de cadeia curta do que em indivíduos magros, como já vimos anteriormente, e a realização do transplante fecal de indivíduos magros para esses indivíduos induziu um aumento da sensibilidade à insulina e um aumento da concentração de microrganismos produtores de butirato nos segundos.⁽⁵⁷⁾ É estritamente necessário fazer uma avaliação de risco às fezes para transplante devido à variabilidade e complexidade microbiana que estas apresentam. Também por este motivo, apenas em situações de forte necessidade se opta por este tratamento.⁽⁵⁸⁾

Os probióticos são microrganismos vivos que, administrados nas quantidades adequadas a um indivíduo, promovem a saúde do mesmo.⁽⁵⁹⁾ Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis e benéficos para o hospedeiro pois estimulam de forma seletiva a proliferação de bactérias desejadas no intestino.⁽⁶⁰⁾ É possível uma combinação entre um probiótico e um prebiótico, designando-se de produto simbiótico, onde os probióticos que o constituem têm já uma exposição e contacto prévios com um determinado prebiótico, o que permite que aquando da sua administração haja uma competitividade na qual a vantagem é do microrganismo presente no probiótico.⁽⁶¹⁾ Os probióticos e os prebióticos têm uma ação importante na melhoria da diabetes mellitus tipo 2, através da secreção de análogos da insulina e promovem o efeito biológico desejado em adipócitos.⁽⁶²⁾ Alguns exemplos são as *L. lactis* e as *Bifidobacterium*.^(63, 64) Apesar da diversidade microbiana não variar entre indivíduos com e sem diabetes mellitus tipo 2, a composição e função do microbioma diferem entre os referidos grupos, nomeadamente no que diz respeito às bactérias produtoras de butirato e a microrganismos patogénicos oportunistas.⁽⁶⁵⁾ Isto aumenta a suscetibilidade a

infecções, doenças imunitárias, inflamação, stress oxidativo e resistência à insulina, sendo estes eventos influenciados pela endotoxemia metabólica que, por sua vez, envolve a exposição a produtos intestinais nocivos, especialmente o LPS já referido anteriormente.⁽⁶⁶⁾ As *Lactobacilli*, as *Bifidobacterium* e outras bactérias intestinais têm a capacidade de atravessar a camada mucosa do intestino e estimular a atividade fagocítica em vários órgãos. Os frutooligossacarídeos, a inulina e outros prebióticos são digeridos pelas *Bifidobacterium*, estimulando o crescimento das suas colónias. Estas bactérias atuam sobre a homeostase das células intestinais, inibindo o crescimento de bactérias patogénicas.^(67, 68) A suplementação com inulina pode melhorar os valores glicémicos e de antioxidação.⁽⁶⁷⁾ Os beta-glucanos e frutanos do tipo inulina são prebióticos que para além de serem fermentados por determinados tipos de bactérias também promovem a proliferação de algumas espécies como é o caso das *Bifidobacterium*⁽⁶⁹⁾, que atuam de forma benéfica para o seu hospedeiro devido à sua influência na inflamação associada à diabetes e no desenvolvimento de obesidade.⁽⁷⁰⁾ Como verificado em vários estudos, os probióticos e os prebióticos possuem a capacidade de melhorar o perfil lipídico, incluindo a redução do nível do colesterol LDL, da concentração do colesterol total no sangue/plasma e da concentração de triglicéridos, assim como de aumentar os níveis de colesterol HDL.⁽⁷¹⁻⁷⁴⁾ Para além disso, alguns probióticos podem promover a produção de AGCC, conduzindo a alterações na secreção das hormonas incretinas, atenuando a síntese de colesterol.⁽⁷⁵⁾ Os AGCC possuem também a capacidade de induzir a apoptose celular, reduzindo o desenvolvimento de várias patologias.^(28, 76) No entanto, nem sempre isto se verificou, estudos mostraram que não ocorreram alterações significativas nos níveis de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicéridos.^(77, 78) Os prebióticos atuam na

estimulação do sistema imunitário, na produção de vitamina B e na inibição do crescimento de microrganismos patogénicos, na diferenciação celular promovendo-a, na interrupção do ciclo celular e na transformação de ácidos biliares primários em secundários diminuindo-a.⁽⁷⁹⁾ Há uma redução significativa nos níveis de glicose plasmática em jejum no grupo suplementado com uma combinação de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* e *Streptococcus thermophilus*) quando comparado com um grupo controlo.⁽⁸⁰⁾ A *Akkermansia muciniphila* (bactéria que degrada a mucina) pode administrar-se para reduzir o desenvolvimento de obesidade e diabetes. Este microrganismo está normalmente presente no microbioma intestinal humano, sendo mais abundante em indivíduos saudáveis do que em indivíduos com obesidade ou diabetes.^(81, 82) Estudos mostraram que a quantidade de *Bifidobacterium* apresenta correlação negativa com a massa gorda, intolerância à glicose e níveis de LPS.^(83, 84)

Os frutanos do tipo inulina interferem no microbioma estimulando a atividade das células imunes e diminuindo o ganho de peso e a massa gorda em indivíduos com obesidade.^(85, 86) Alguns probióticos são capazes de reduzir a aderência à mucosa e a translocação bacteriana das bactérias gram-negativas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, invertendo assim a resposta inflamatória de baixo grau e atenuando, consequencialmente, a inflamação do tecido adiposo e outras características da diabetes mellitus tipo 2.⁽⁷¹⁾ Os probióticos podem promover a antioxidação na diabetes do tipo 2, de facto a atividade da superóxido dismutase do eritrócito e da peroxidase do glutatião e os antioxidantes totais aumentam em grupos suplementados com probióticos quando comparados com outros não suplementados.⁽⁸⁷⁾ A inflamação de baixo grau em indivíduos com obesidade pode

ser atenuada por peptídeos produzidos por microrganismos do microbioma intestinal e, assim, a composição do microbioma afeta a produção desses peptídeos. Um exemplo é a proteína A3 amilóide sérica, cuja expressão no tecido adiposo é regulada pelo microbioma intestinal^(88, 89) e é maior no tecido adiposo e cólon de animais possuidores de um microbioma considerado normal do que em animais sem microbioma.⁽⁹⁰⁾

Para além do transplante fecal e da utilização de prebióticos e probióticos, existe um outro tratamento que se baseia nas *intestinal microbial network units*. Cada uma dessas unidades contém uma associação de microrganismos capazes de realizar funções específicas que podem aplicar-se, nomeadamente, na degradação de polissacarídeos complexos específicos, na indução de vias imunitárias específicas e até mesmo um conjunto de microrganismos simbiotes específicos pode combinar-se para um determinado estágio de vida humana, como por exemplo uma mistura microbiana específica para recém-nascidos.⁽⁵⁸⁾

Análise crítica e conclusões

Os estudos analisados sobre o tema em questão permitem-me concluir que existe uma associação entre o microbioma intestinal e a patologia metabólica, havendo assim a possibilidade de atuar em diversas situações utilizando tratamentos que envolvem alterações no microbioma. A discrepância nas conclusões dos estudos que falam da eficácia dos probióticos e dos prebióticos na modulação da microbiota intestinal poderá ser atribuída a um desenho experimental desadequado. Assim, mais estudos são necessários para aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos específicos que permitem a modulação benéfica para a saúde do microbioma intestinal.

Referências Bibliográficas

1. Duca FA, Lam TK. Gut microbiota, nutrient sensing and energy balance. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2014; 16 Suppl 1:68-76.
2. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009; 58(7):1509-17.
3. Yang JY, Kweon MN. The gut microbiota: a key regulator of metabolic diseases. *BMB reports*. 2016; 49(10):536-41.
4. Schippa S, Conte MP. Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health. *Nutrients*. 2014; 6(12):5786-805.
5. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2015; 74(1):13-22.
6. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature reviews Microbiology*. 2014; 12(10):661-72.
7. Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belenguer A, McWilliam Leitch C, Scott KP, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME journal*. 2014; 8(6):1323-35.
8. Salonen A, Lahti L, Salojarvi J, Holtrop G, Korpela K, Duncan SH, et al. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *The ISME journal*. 2014; 8(11):2218-30.
9. Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental microbiology*. 2010; 12(2):304-14.

10. Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS, Flint HJ. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of bacteriology*. 2004; 186(7):2099-106.
11. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and environmental microbiology*. 2007; 73(4):1073-8.
12. Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilan CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in microbiology*. 2016; 7:185.
13. Cantarel BL, Lombard V, Henrissat B. Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PloS one*. 2012; 7(6):e28742.
14. Fischbach MA, Sonnenburg JL. Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell host & microbe*. 2011; 10(4):336-47.
15. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013; 504(7480):446-50.
16. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome biology*. 2012; 13(9):R79.
17. Fu J, Bonder MJ, Cenit MC, Tigchelaar EF, Maatman A, Dekens JA, et al. The Gut Microbiome Contributes to a Substantial Proportion of the Variation in Blood Lipids. *Circulation research*. 2015; 117(9):817-24.
18. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research*. 2006; 47(2):241-59.

19. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(11):9435-40.
20. Sato H, Genet C, Strehle A, Thomas C, Lobstein A, Wagner A, et al. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007; 362(4):793-8.
21. Ge H, Li X, Weiszmann J, Wang P, Baribault H, Chen JL, et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology*. 2008; 149(9):4519-26.
22. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105(43):16767-72.
23. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine*. 2012; 18(3):363-74.
24. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Backhed F. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell metabolism*. 2015; 22(4):658-68.
25. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine*. 2009; 15(8):930-9.
26. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet (London, England)*. 2006; 368(9548):1696-705.

27. Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y, et al. Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology*. 2006; 147(7):3276-84.
28. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006; 40(3):235-43.
29. Abbas A. *Basic Immunology*. 2006.
30. Moreira AP, Texeira TF, Ferreira AB, Peluzio Mdo C, Alfenas Rde C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *The British journal of nutrition*. 2012; 108(5):801-9.
31. Kolata G. Eggs, Too, May Provoke Bacteria to Raise Heart Risk. *The New York Times*. 2013
32. Org E, Blum Y, Kasela S, Mehrabian M, Kuusisto J, Kangas AJ, et al. Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome biology*. 2017; 18(1):70.
33. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *The pharmacogenomics journal*. 2013; 13(6):514-22.
34. Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2011; 141(5):1792-801.
35. de Souza AZ, Zambom AZ, Abboud KY, Reis SK, Tannihao F, Guadagnini D, et al. Oral supplementation with L-glutamine alters gut microbiota of obese and

overweight adults: A pilot study. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif).

2015; 31(6):884-9.

36. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* (New York, NY). 2011; 334(6052):105-8.

37. Org E, Parks BW, Joo JW, Emert B, Schwartzman W, Kang EY, et al. Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. *Genome research*. 2015; 25(10):1558-69.

38. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*. 2014; 159(4):789-99.

39. Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, Gonzalez A, Fontana L, et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* (New York, NY). 2011; 332(6032):970-4.

40. Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*. 2014; 146(6):1449-58.

41. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(33):14691-6.

42. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013; 500(7464):541-6.

43. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013; 500(7464):585-8.
44. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006; 444(7122):1022-3.
45. Schwartz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2010; 18(1):190-5.
46. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity (2005)*. 2008; 32(11):1720-4.
47. Parks BW, Nam E, Org E, Kostem E, Norheim F, Hui ST, et al. Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell metabolism*. 2013; 17(1):141-52.
48. Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Current opinion in pharmacology*. 2009; 9(6):737-43.
49. Riserus U, Willett WC, Hu FB. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in lipid research*. 2009; 48(1):44-51.
50. Burcelin R, Garidou L, Pomie C. Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic diseases. *Seminars in immunology*. 2012; 24(1):67-74.
51. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science (New York, NY)*. 2012; 336(6086):1262-7.

52. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Backhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*. 2013; 62(10):3341-9.
53. Rebello CJ, Burton J, Heiman M, Greenway FL. Gastrointestinal microbiome modulator improves glucose tolerance in overweight and obese subjects: A randomized controlled pilot trial. *Journal of diabetes and its complications*. 2015; 29(8):1272-6.
54. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*. 2006; 444(7121):854-9.
55. Geliebter A, Grillot CL, Aviram-Friedman R, Haq S, Yahav E, Hashim SA. Effects of oatmeal and corn flakes cereal breakfasts on satiety, gastric emptying, glucose, and appetite-related hormones. *Annals of nutrition & metabolism*. 2015; 66(2-3):93-103.
56. Leszczyszyn JJ, Radomski M, Leszczyszyn AM. Intestinal microbiota transplant - current state of knowledge. *Reumatologia*. 2016; 54(1):24-8.
57. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012; 143(4):913-6.e7.
58. Van den Abbeele P, Verstraete W, El Aidy S, Geirnaert A, Van de Wiele T. Prebiotics, faecal transplants and microbial network units to stimulate biodiversity of the human gut microbiome. *Microbial biotechnology*. 2013; 6(4):335-40.
59. Sanders ME. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition reviews*. 2003; 61(3):91-9.
60. Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads and fantasy to facts and future. *The British journal of nutrition*. 2002; 88 Suppl 1:S5-9.

61. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006; 42:1-16.
62. Matis G, Kulcsar A, Turowski V, Febel H, Neogrady Z, Huber K. Effects of oral butyrate application on insulin signaling in various tissues of chickens. *Domestic animal endocrinology*. 2015; 50:26-31.
63. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V, et al. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of dairy science*. 2011; 94(7):3288-94.
64. Naito E, Yoshida Y, Makino K, Kounoshi Y, Kunihiro S, Takahashi R, et al. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *Journal of applied microbiology*. 2011; 110(3):650-7.
65. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one*. 2010; 5(2):e9085.
66. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008; 57(6):1470-81.
67. Pourghassem Gargari B, Dehghan P, Aliasgharzadeh A, Asghari Jafar-Abadi M. Effects of high performance inulin supplementation on glycemic control and antioxidant status in women with type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism journal*. 2013; 37(2):140-8.
68. Przemyslaw JT, P.T. . Probiotics and prebiotics. *Cereal Chemistry*. 2003:113–17.

69. Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD. Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *The British journal of nutrition*. 2013; 109 Suppl 2:S81-5.
70. Druart C, Alligier M, Salazar N, Neyrinck AM, Delzenne NM. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic and probiotic properties. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*. 2014; 5(5):624s-33s.
71. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermudez-Humaran LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO molecular medicine*. 2011; 3(9):559-72.
72. Jones ML, Martoni CJ, Di Pietro E, Simon RR, Prakash S. Evaluation of clinical safety and tolerance of a *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 supplement capsule: a randomized control trial. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. 2012; 63(2):313-20.
73. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergstrom G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013; 498(7452):99-103.
74. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012; 490(7418):55-60.
75. Ryan PM, Ross RP, Fitzgerald GF, Caplice NM, Stanton C. Functional food addressing heart health: do we have to target the gut microbiota? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2015; 18(6):566-71.
76. Slavin J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 2013; 5(4):1417-35.

77. Mahboobi S, Iraj B, Maghsoudi Z, Feizi A, Ghiasvand R, Askari G, et al. The effects of probiotic supplementation on markers of blood lipids, and blood pressure in patients with prediabetes: a randomized clinical trial. *International journal of preventive medicine*. 2014; 5(10):1239-46.
78. Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Moller K, Svendsen KD, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *The British journal of nutrition*. 2010; 104(12):1831-8.
79. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*. 1995; 125(6):1401-12.
80. Asemi Z, Zare Z, Shakeri H, Sabihi SS, Esmailzadeh A. Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Annals of nutrition & metabolism*. 2013; 63(1-2):1-9.
81. Santacruz A, Collado MC, Garcia-Valdes L, Segura MT, Martin-Lagos JA, Anjos T, et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *The British journal of nutrition*. 2010; 104(1):83-92.
82. Liou AP, Paziuk M, Luevano JM, Jr., Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Science translational medicine*. 2013; 5(178):178ra41.
83. Delzenne NM, Cani PD, Daubioul C, Neyrinck AM. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *The British journal of nutrition*. 2005; 93 Suppl 1:S157-61.

84. Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *The Journal of nutrition*. 2007; 137(11 Suppl):2547s-51s.
85. Cani PD, Dewever C, Delzenne NM. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *The British journal of nutrition*. 2004; 92(3):521-6.
86. Yin YN, Yu QF, Fu N, Liu XW, Lu FG. Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. *World journal of gastroenterology*. 2010; 16(27):3394-401.
87. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2012; 28(5):539-43.
88. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut microbes*. 2012; 3(4):279-88.
89. Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes care*. 2010; 33(10):2277-84.
90. Delzenne NM, Neyrinck AM, Backhed F, Cani PD. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature reviews Endocrinology*. 2011; 7(11):639-46.