

Influência da Microflora Intestinal na Etiopatogenia e Terapêutica da Diabetes Mellitus Tipo 2

The Influence of Gut Microbiota on Etiopathogeny and Therapeutics of Type 2 Diabetes Mellitus

J. Lourenço¹, J. Dores²

1- Interno do Ano Comum do Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, Portugal

2- Assistente Graduado de Endocrinologia, Serviço de Endocrinologia do Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal

Resumo

Introdução: O trato gastrointestinal humano é habitualmente colonizado por um grupo diverso de microrganismos denominado microflora. Uma alteração na sua composição pode conduzir a um estado de "disbiose", isto é, a interação microflora-hospedeiro pode tornar-se instável, provocando o aparecimento de distúrbios metabólicos designadamente a diabetes *mellitus* tipo 2.

Objectivo: Esta revisão bibliográfica pretende divulgar a mais recente evidência científica publicada sobre o impacto da microflora intestinal no desenvolvimento da diabetes *mellitus* tipo 2 e quais os potenciais efeitos terapêuticos da sua modulação.

Métodos: Procedeu-se a uma revisão de publicações em revistas internacionais entre 1999-2015 sobre a influência da microflora intestinal no metabolismo do hospedeiro e o impacto da sua modulação no tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2.

Foram consultadas as bases de dados PubMed e ScienceDirect, usando as palavras-chave "gut microbiota" e "diabetes".

Resultados: A microflora intestinal de indivíduos insulinoresistentes apresenta um baixo ratio de *Bacteroidetes/Firmicutes*. A modulação da microflora em estudos animais e humanos parece levar ao crescimento de bactérias reguladoras do metabolismo lipídico, melhorando a sensibilidade à insulina e o controlo glicémico.

Conclusões: No contexto da diabetes *mellitus* tipo 2, existe evidência científica significativa que corrobora o potencial terapêutico de agentes como prebióticos, probióticos e antibióticos. O transplante fecal é uma estratégia inédita mas carece de subsequente investigação.

Abstract

Introduction: The human gastrointestinal tract is colonized by a diverse group of organisms known as microbiota, which has the ability to establish a mutualistic interaction with the host. An unbalanced interaction is called dysbiosis and there's evidence that it can be involved in metabolic disorders such as the type 2 diabetes *mellitus*.

Aim: To review the most recent scientific evidence regarding the impact of gut microbiota on the development of type 2 diabetes *mellitus* as well as the therapeutic effects of its modulation.

Methods: We performed a review of international publications between 1999-2015 on gut microbiota's influence in the metabolic homeostasis of the host and the impact of its modulation in diabetic patients. Our research was based upon online databases such as PubMed and ScienceDirect using the key-words "gut microbiota" and "diabetes".

Results: The gut microbiota of insulin resistant individuals showed a reduced ratio of *Bacteroidetes/Firmicutes*. The usage of microbial modulators in animal and human trials seemed to stimulate the bacterial growth involved in lipid metabolism, resulting in a better insulin sensitivity and glycemic management.

Conclusions: When it comes to treating type 2 diabetes *mellitus*, there's scientific evidence that corroborates the benefits of microbiota modulators (prebiotics, probiotics and antibiotics); the faecal transplant is a new solution that needs further investigation in order to validate its application in diabetic patients.

CORRESPONDÊNCIA

Jorge Lourenço
Centro de Formação / Internato Médico
Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, EPE
Unidade de Santa Maria da Feira
Rua Dr. Cândido de Pinho
4520-211 Santa Maria da Feira

> 1. INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* (DM) representa uma das grandes epidemias deste século e um dos distúrbios metabólicos com maior impacto na saúde da população mundial. A patogénese desta doença é influenciada a nível genético, imunológico e ambiental, pelo que a comunidade científica tem procurado esclarecer o papel desempenhado por um agente capaz de intervir nestes três níveis: a microflora intestinal ^[1].

> 2. MUTUALISMO MICROFLORA-HOSPEDEIRO

O ser humano vive numa relação simbiótica com um vasto número e diversidade de microrganismos, cujo património genético recebe a definição de microbioma. O microbioma intestinal é significativamente mais extenso do que o genoma humano e encerra importantes funções biológicas e metabólicas ainda não totalmente conhecidas ^[2]. Estes microrganismos são fundamentalmente bactérias e colonizam vários tecidos do organismo humano. A maior população bacteriana localiza-se no trato gastrointestinal, predominantemente no cólon, é maioritariamente anaeróbia e divide-se em quatro *Fila* principais: *Firmicutes* (inclui espécies de *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Clostridium*), *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* (inclui o género *Bifidobacterium*) e *Proteobacteria*; os 2 primeiros são os *Fila* dominantes ^[3]. O intestino humano é estéril durante o desenvolvimento *in-utero* e, ao nascimento, a passagem pelo canal do parto dá início ao fenómeno de colonização ^[4]. Imediatamente após o nascimento, a flora intestinal do bebé vai sendo modulada pela exposição a bactérias ambientais oriundas da pele, do leite materno, entre outros, atingindo a sua maturidade nos primeiros 2 anos de vida (idade de transição entre uma dieta baseada na amamentação – alto teor lipídico – e uma dieta rica em hidratos de carbono) ^[5,6]. Durante a infância, as espécies de *Bifidobacterium* são os principais agentes colonizadores intestinais ^[6]. À medida que o indivíduo se aproxima da idade adulta, a composição microbiana intestinal vai evoluindo de acordo com certos padrões ambientais, designadamente a dieta alimentar ^[7]. Na população idosa assiste-se a um aumento da proporção de *Bacteroides* e de *Clostridium* ^[8]. Durante a maior parte da idade adulta, o perfil microbiano mantém-se estável, sobretudo devido à tolerância imune vigente, que identifica estas bactérias como “inofensivas” ^[9].

A dieta alimentar é um dos principais vectores ambientais capaz de influenciar a proporção das diferentes espécies bacterianas que compõem a flora, condicionan-

do a diversidade funcional da flora intestinal. Por outro lado, o processo digestivo também é protagonizado por estes microrganismos, que participam na absorção de hidratos de carbono de origem vegetal (sem estas bactérias os mesmos não seriam digeríveis) ^[10]; na síntese de vitaminas (biotina, vitamina K, ácido fólico) ^[11], na conversão de proteínas lácteas em ácido láctico (função desempenhada pelas espécies de *Lactobacillus*) ^[12], no metabolismo de produtos potencialmente nocivos (bilirrubina, colesterol, aminas heterocíclicas e oxalato) ^[13], na degradação e fermentação de polissacarídeos (são convertidos em ácidos gordos de cadeia curta - AGCCs) ^[13]. Este último mecanismo ocorre no cólon e origina os seguintes AGCCs: acetato (C3) propionato (C4) e butirato (C5) ^[14]. Estas moléculas promovem um efeito anti-inflamatório ao inibirem a libertação de citocinas pró-inflamatórias.

O acetato e propionato atuam sobre células da imunidade inata como os neutrófilos ^[15], enquanto o butirato inibe o factor de transcrição nuclear *kappa B* (NF- κ B) ^[16]. Os AGCCs são absorvidos no cólon, estimulando a absorção cólica de água e sódio e contribuindo para mais de 10% das necessidades calóricas do hospedeiro ^[17]. Podem ainda atuar como ligandos de receptores da superfície das células entero-endócrinas, estimulando a secreção do peptídeo YY (PYY), responsável pela inibição da motilidade intestinal, prolongamento do trânsito intestinal e consequente melhoria da absorção dos nutrientes ^[18]. Mas este mutualismo ecológico flora-hospedeiro estende-se para além do processo digestivo, envolvendo ainda a produção de mediadores anti-microbianos/competição direta com os potenciais patogéneos ^[19], a imuno-modulação do hospedeiro (acumulação de células T reguladoras na mucosa cólica, prevenindo o desenvolvimento de processos inflamatórios locais) ^[20], a manutenção da barreira epitelial intestinal (*turnover* epitelial intestinal), o metabolismo de fármacos, a angiogénese ^[21] e, finalmente, o desenvolvimento cerebral através de mecanismos de sinalização envolvidos na atividade motora e na ansiedade ^[22].

> 3. MICROFLORA INTESTINAL E DM2

3.1. Relação Microflora-obesidade

A patogenia da diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) assenta num modelo multifactorial que DeFronzo descreveu como um octeto ^[23]: insulinoresistência periférica, disfunção de células α pancreáticas, insuficiência relativa das células β pancreáticas, aumento excessivo da reabsorção renal de glicose, diminuição da atividade das incre-

tinhas, disfunção do tecido adiposo, tolerância do sistema nervoso central (SNC) ao estado hiperglicémico e alteração do metabolismo dos lípidos. Nos últimos anos tem surgido um particular interesse em clarificar o papel desempenhado pela microflora intestinal no desenvolvimento da obesidade e DM2 [24,25].

Os primeiros estudos com animais verificaram que ratos assépticos (livres de *germens*) alimentados com uma dieta de predomínio lipídico não desenvolviam obesidade [24,26]; após a colonização intestinal destes ratos com bactérias obesigénicas, a sua massa gorda aumentou em 40% [27]. A evidência disponível tanto nos modelos animais como nos estudos em humanos revelou que indivíduos obesos e insulinoresistentes apresentam um perfil microbiano intestinal caracterizado por uma redução no *ratio* de *Bacteroidetes*/*Firmicutes* [29-31,40] e na contagem de outras espécies benéficas como *Faecalibacterium prausnitzii* (potencial ação anti-inflamatória) [32]. A influência da dieta alimentar na microflora intestinal tem particular importância no desenvolvimento da DM2, ao potenciar o crescimento de determinados microrganismos que, por sua vez, modulam negativamente o metabolismo do hospedeiro [33]. Um estudo envolvendo indivíduos com DM2 no Sul da China revelou uma maior fração populacional de *Lactobacillus* e, em contrapartida, uma menor contagem de *Bifidobacterium* [34].

Contudo permanece a incógnita: a obesidade será causa ou consequência das alterações microbianas vigentes?

O mutualismo flora-hospedeiro destaca os primeiros 2 anos de vida como a chave para o desenvolvimento sustentável da flora intestinal. Pensa-se que durante a infância, o risco de colonização intestinal por espécies ditas "obesigénicas" (ex: *Enterobacteriaceae*; *C. difficile*) em detrimento de espécies "anti-obesigénicas" (*Bacteroides*; *Bifidobacteria*) esteja relacionado com certos factores designadamente o parto por cesariana [35], o aleitamento com leite artificial [36] e a antibioterapia [37]. Esta opinião ainda não é consensual, sobretudo pela complexidade do estilo de vida humano (frequência e composição das refeições, etnia, entre outros aspetos) [38-43].

3.2. A "Endotoxemia Metabólica"

A patogénese da DM2 envolve o desenvolvimento de uma resposta inflamatória de baixo grau que poderá ser desencadeada pela microflora intestinal e modulada pelo sistema imunitário do hospedeiro [44,45]. A evidência científica publicada refere que o lipopolissacarídeo LPS (constitutivo da membrana externa das bactérias Gram negativas) poderá desempenhar um papel pró-inflamatório

em indivíduos obesos e insulinoresistentes [46,47], ao estimular a secreção de citocinas como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) [48-50]. Cani e seus colaboradores demonstraram que ratos alimentados com dieta de predomínio lipídico desenvolviam obesidade, sofriam uma redução da contagem de bactérias Gram + intestinais associada a um aumento considerável (2-3 vezes) nos níveis séricos de LPS, ao qual se denominou "endotoxemia metabólica" [51]. A concentração plasmática do LPS pode aumentar como consequência do aumento da sua produção/ absorção intestinais e relaciona-se com uma maior permeabilidade do intestino, seja por alterações na barreira intestinal (ex: diminuição da expressão de zonulina e claudina) [52], seja pelo teor lipídico da dieta (ex: o LPS pode integrar os *quilomicrons*) [53]. Estes efeitos não se observaram em dietas ricas em proteínas, hidratos de carbono, fibras ou fruta [54,55]. Os inúmeros estudos publicados permitiram a elaboração da *Teoria do Armazenamento*, que atribui à microflora intestinal uma ação moduladora do metabolismo lipídico do hospedeiro (Figura 1) [56]. Segundo esta teoria, o consumo excessivo de gorduras saturadas favorece uma maior absorção intestinal de LPS via *quilomicrons*; posteriormente, esta molécula transita para a circulação sanguínea, sendo capaz de estimular determinados agentes pró-inflamatórios como o TNF- α , o qual promove uma diminuição da sensibilidade periférica à insulina [56]. Uma vez instalado o estado de insulinoresistência, o hospedeiro tenta satisfazer as suas necessidades energéticas através de uma maior atividade lipolítica, a qual aumenta o influxo hepático de ácidos gordos livres e, conseqüentemente, aumenta a lipogénese [56,57]. Se a β -oxidação for ultrapassada por uma excessiva lipogénese, então assiste-se a uma gradual acumulação hepática de gordura e conseqüente aumento do *stress oxidativo* local, o qual estimula a diferenciação das células estreladas ou de Ito (habitualmente armazenam vitamina A sob a forma de ésteres de retinol) em fibroblastos, promovendo o desenvolvimento de fibrose hepática [57,58].

3.3. Terapêutica – Modulação da Microflora

O estudo da ação microbiana intestinal no desenvolvimento da DM2 tem motivado a procura de novas estratégias terapêuticas com potencial curativo.

3.3.1. Prebióticos

Os prebióticos são ingredientes alimentares não-digeríveis, que promovem o crescimento e colonização in-

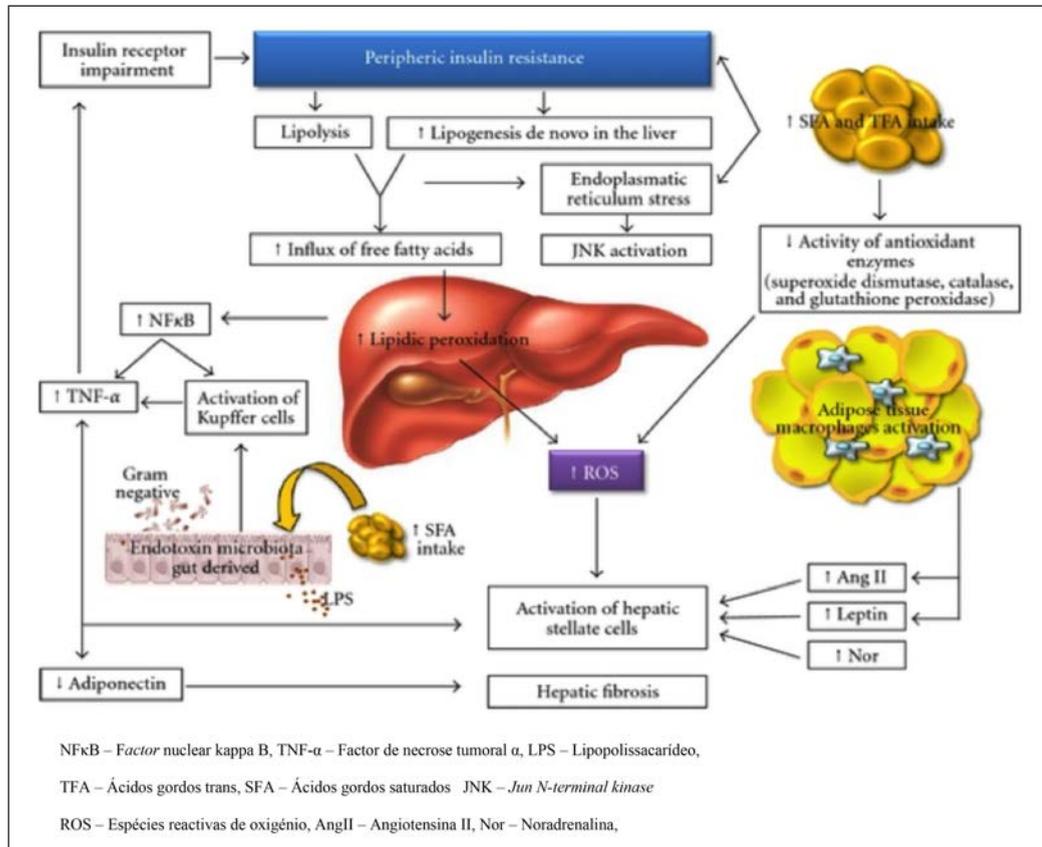


Figura 1 - Resumo da Teoria do Armazenamento (Adaptado de Estadella, et al. 2013) [56].

sacarídeos (GOS) [66]. De um modo geral, a sua utilização poderá aumentar os níveis circulantes de GLP-1 e GLP-2, preservando a barreira intestinal e diminuindo o risco de endotoxemia [66]. O uso de fármacos com acção moduladora de GLP-2 poderá, também, ser uma aposta interessante em futuras investigações. A estimulação de peptídeos como a grelina e o PYY pode também potenciar uma maior tolerância à glicose [67].

Alguns prebióticos desempenham funções análogas a determinados fármacos anti-diabéticos, nomeadamente os glucomannanos (presentes na

testinais de agentes comensais do intestino, sobretudo no cólon (ex: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*), com impacto positivo na saúde do hospedeiro [59]. Estes agentes não são hidrolisados/absorvidos no trato gastrointestinal proximal e sofrem fermentação bacteriana no cólon [59]. Estes elementos são frequentemente usados como fibras solúveis [60] e podem ser encontrados em vários alimentos, sobretudo frutas (ex: banana) e vegetais (ex: cebola, alcachofra, alho) [61].

Os oligossacarídeos são os principais elementos, podendo derivar de frutose, manose, xilose, galactose, entre outros [62]. Curiosamente, estes produtos podem servir de substrato para os probióticos e, desse modo, desenvolver um efeito terapêutico sinérgico [62].

Pensa-se que a fermentação dos prebióticos estimule a secreção de certos mediadores pelas células entero-endócrinas tipo L [63-65] como os *glucagon-like peptide* (GLP), concretamente GLP-1 (regula a secreção de insulina e glucagon, a utilização periférica de glicose e o fluxo vascular) e GLP-2 (mantém a integridade da barreira intestinal, protegendo-a contra o LPS). No contexto da DM2, destacam-se 2 prebióticos com benefício terapêutico, os frutoligosacarídeos (FOS) e galactoligos-

massa e feijão, capazes de atrasar a absorção intestinal de hidratos de carbono e potenciar a acção de GLP-1) [68], questose e nistose (comportam-se como agonistas do receptor peroxissomal PPAR-γ e como inibidores da dipeptidil-peptidase 4 - DPP4) [69]. A utilização de inulina ou análogos normaliza os níveis séricos de AGCCs e LPS, reduzindo ainda a concentração de citocinas inflamatórias e promovendo o crescimento de *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium prausnitzii*, espécies habitualmente escassas em indivíduos diabéticos [70-72].

Existem outros componentes alimentares (ex: compostos fenólicos presentes na fruta, vegetais e chocolate) que, por chegarem intactos à porção distal do trato gastrointestinal, poderão atuar como prebióticos [73]. O uso combinado de vitamina D com prebióticos [74] ou o consumo de sumo de romã [75] são também exemplos positivos na indução do aumento da sensibilidade à insulina e melhoria do controlo glicémico.

3.3.2. Probióticos

Os probióticos consistem em suplementos microbianos vivos que, quando ingeridos, promovem a adesão bac-

teriana à mucosa intestinal [76], exercendo um papel regulador da permeabilidade intestinal e da atividade do sistema imune, através da produção da imunoglobulina IgA e secreção da interleucina IL-10 [77,78].

Os probióticos mais comuns pertencem sobretudo aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, presentes em produtos lácteos como o leite fermentado e iogurtes. A evidência publicada em estudos animais e humanos diabéticos tem revelado que a utilização destes agentes (nomeadamente o kefir, um derivado do leite semelhante ao iogurte) potencia um melhor controlo do perfil lipídico e da insulinoresistência, assumindo-se como complementos ao tratamento farmacológico existente [79,80,83]. Por exemplo, o consumo de leite contendo *L. gasseri* ou *L. casei* em indivíduos com síndrome metabólica contribuiu para uma redução da gordura visceral e subcutânea, com consequente diminuição do índice de massa corporal [81,82]. A ingestão de alimentos enriquecidos com elementos probióticos é hoje uma realidade mas ainda não existe uma dose mínima consensual para se obter o efeito anti-diabetogénico pretendido. Contudo, foram obtidos benefícios significativos nos níveis de hemoglobina glicada A1c com o consumo de um batido composto por 4×10^8 UFC/100 ml de *L. acidophilus* e 4×10^8 UFC de *B. bifidum* [84], bem como através do consumo iogurte contendo 7.23×10^8 UFC/100 ml de *L. acidophilus* e 6.04×10^8 UFC de *B. lactis* [85].

3.3.3. Antibióticos

A influência microbiana no desenvolvimento da DM2 levou a que muitos investigadores considerassem esta doença como uma “doença infecciosa”, sobretudo por existirem determinadas espécies bacterianas capazes de influenciar negativamente a homeostasia metabólica do hospedeiro [86]. Nesse sentido, tem sido estudado o papel modulador da antibioterapia no tratamento desta doença. A evidência disponível em estudos envolvendo ratos obesos e insulinoresistentes revelou que a administração combinada de ampicilina com neomicina (deprime os níveis cecais de LPS) ou norfloxacin poderá melhorar a tolerância à glicose e normalizar os níveis de glicemia pré-prandial [87-88]. Mas, a par destes estudos, existem outros que concluíram o oposto e que associam o uso de antibioterapia crónica a uma diminuição de bactérias anti-obesigénicas e a uma menor diversidade microbiana intestinal. De facto, o uso de vancomicina [89] ou β -lactâmicos [90] em humanos promoveu, a longo prazo, um aumento do índice de massa corporal e consequente obesidade.

Estes resultados contraditórios vêm mostrar a carência

de evidência disponível sobre quais as espécies bacterianas intestinais que podem ser erradicadas pelas diferentes classes de antibióticos e se as mesmas são benéficas ou nocivas para o metabolismo do hospedeiro.

3.3.4. Transplante Fecal

Uma das estratégias terapêuticas inovadoras corresponde ao transplante fecal (TF).

Este procedimento tem sido amplamente estudado no contexto de infeções recorrentes por *C. difficile* (principal agente etiológico da colite pseudomembranosa) [91] e na diarreia associada a antibioterapia crónica [92]. De um modo geral o TF pode ser autólogo, envolver um ou mais dadores (estes indivíduos devem ser saudáveis e não podem apresentar determinadas bactérias na sua microflora) ou pode ainda ser realizado através da combinação laboratorial de amostras fecais com espécies comensais anaeróbias oriundas de diferentes dadores [93]. Os efeitos laterais conhecidos do TF são, na generalidade, ligeiros e transitórios [94] mas ainda não se conhecem totalmente as implicações desta técnica em indivíduos imunodeprimidos [95].

A aplicabilidade do TF tem sido analisada em inúmeras patologias, desde doença inflamatória intestinal [96], doenças neurodegenerativas [97] até distúrbios metabólicos, nomeadamente a DM2 [97]. Neste contexto, foi realizado um TF de dador magro (IMC <23kg/m²) e saudável em indivíduos com síndrome metabólica. Seis semanas depois, verificou-se uma maior sensibilidade à insulina associado a uma maior contagem de bactérias intestinais produtoras de butirato [98].

O butirato é um AGCC produzido por *Firmicutes* e que satisfaz cerca de 60-70% das necessidades energéticas dos colonócitos, estando envolvido na integridade da barreira epitelial intestinal e com potencial ação oncosupressora (induz a apoptose e inibe a proliferação de células tumorais) [99,100]. Existe um caso clínico recente de uma infeção recorrente por *C. difficile* numa mulher de 32 anos (IMC de 26 kg/m²) tratada com TF e cujo dador foi a filha de 16 anos. No momento do TF, a filha tinha um IMC de 26.4 kg/m² mas ao fim de 36 meses, ambas aumentaram significativamente de peso e de forma involuntária (o IMC final da doente foi 34.5 kg/m²) [101]. Neste caso, não foi possível concluir qual o impacto do microbioma da filha no metabolismo da mãe visto que o seu perfil microbiano intestinal não foi previamente determinado [102].

São necessários ensaios a uma maior escala de modo a compreender a amplitude do espectro de ação da microflora intestinal nos diferentes sistemas orgânicos do

hospedeiro [102]. Apesar da evidência disponível ser ainda insuficiente, o TF poderá assumir-se no futuro como uma alternativa ao tratamento convencional da DM2 [86,103]. Atualmente o TF não está devidamente classificado pela Agência Europeia do Medicamento; se o ser humano for encarado como um “super-organismo”, em que a microflora se assume como parte integrante da sua constituição, esta técnica poderá, eventualmente, ser regulamentada de forma similar às transfusões sanguíneas, por exemplo.

> 4. CONCLUSÃO

Os microrganismos que compõem o microbioma são os descendentes, à escala celular, das primeiras formas de vida na Terra. De facto, o sucesso da evolução da espécie humana beneficiou de uma interação profícua com a sua microflora. Contudo, pensa-se que esta dinâmica inter-espécies contribua também para o aparecimento de determinadas patologias, nomeadamente a DM2.

O estudo da microflora intestinal permitiu diferenciar o microbioma intestinal de indivíduos saudáveis daqueles com DM2, mas carece ainda de subsequente investigação.

Tanto os prebióticos como os probióticos revelaram um importante papel regulador do metabolismo da glicose e da insulinosensibilidade.

O uso de antibióticos poderá, teoricamente, alterar significativamente a composição do microbioma intestinal, mas ainda se desconhece se esta modulação é inequivocamente positiva ou negativa para o equilíbrio metabólico do hospedeiro, não sendo possível validar o potencial terapêutico desta classe farmacológica na DM2. O TF é a mais inovadora e surpreendente estratégia terapêutica da DM2; as potencialidades deste procedimento necessitam ainda de ser exploradas; uma vez confirmada a sua viabilidade, este poderá revolucionar o programa terapêutico da DM2. <

BIBLIOGRAFIA

1. Egger G, Dixon J. Beyond Obesity and Lifestyle: A Review of 21st Century Chronic Disease Determinants. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 731685.
2. Nielsen D, Krych L, Buschard K, Hansen C, Hansen A. Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes. *FEBS Lett*. 2014; 588(22): 4234-43.
3. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel

- diseases. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104: 13780-13785.
4. Cani PD, Everard A. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2013; 27: 73-83.
5. Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM. A microbial world within us. *Mol Microbiol*. 2006; 59: 1639-1650.
6. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relam DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biol*. 2007; 5 (7): 1556-1573.
7. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*. 1996; 4: 430-435.
8. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol*. 2009; 11(10): 2574-2584.
9. Zaneveld J, Turnbaugh PJ, Lozupone C, Ley RE, Hamady M, Gordon JI, et al. Host-bacterial coevolution and search for new drug targets. *Curr Opin Chem Biol*. 2008; 12: 109-14.
10. Wong JM, Jenkins DJ. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *J Nutr*. 2007; 137: 2539-2546.
11. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006; 7: 668-93.
12. Gorbach SL. Lactic acid bacteria and human health. *Ann Med*. 1990; 22: 37-41.
13. Blumberg R, Powrie F. Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey. *Science Translational Medicine*. 2012; 4: 137.
14. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*. 2002; 22: 283-307.
15. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009; 461: 1282-1286.
16. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000; 47: 397-403.
17. Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM, Schmitt Jr MG. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology*. 1980; 78: 1500-1507.
18. 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 16767-16772.
19. Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. *Immunology*. 2013; 138: 1-11.
20. Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*. 2012; 149: 1578-93.
21. Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van Baarlen P. Epithelial cross-talk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 4607-4614.

22. Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108(7): 3047-3052.
23. DeFronzo RA. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 2009; 58: 773-795.
24. Burcelin R, Serino M, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J. Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol*. 2011; 48: 257-273.
25. Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulinresistant mice. *Proc Natl Acad*. 2006; 103(33): 12511-12516.
26. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104(3): 979-984.
27. Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O'Sullivan O, Fouhy, F et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*. 2010; 59(12): 1635-1642.
28. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008; 3: 213-223.
29. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*. 2009; 1: 1-10.
30. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci*. 2005; 102: 11070-11075.
31. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006; 444: 1022-1023.
32. O'Mahony D, Murphy S, Boileau T, Park J, O'Brien F, Groeger D, et al. *Bifidobacterium animalis* AHC7 protects against pathogen-induced NF-kappaB activation in vivo. *BMC Immuno*. 2010; 11: 1-9.
33. Musso G, Gambino R, Cassader M. The hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care*. 2010; 33: 2277-2284.
34. Lê KA, Li Y, Xu X, Yang W, Liu T, Zhao X, et al. Alterations in fecal *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in type 2 diabetic patients in Southern China population. *Frontiers in Physiology. Gastrointestinal Sciences*. Jan 2013; 3:1-6.
35. Hällström, M., Eerola E, Vuento R, Janas M, Tammela O. Effects of mode of delivery and necrotizing enterocolitis on the intestinal microflora in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 463-470.
36. Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C, Stobberingh EE. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 243: 141-147.
37. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol*. 2008; 6: 2383-2400.
38. Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Martí A, Martín-Matillas M, Campoy C, et al. EVASYON Study Group. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity*. 2009; 17: 1906-1915.
39. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes*. 2008; 32: 1720-1724.
40. Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Garagorri M, Moreno LA, et al. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulincoating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes*. 2009; 33: 758-767.
41. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 2365-2370.
42. Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol*. 2010; 61: 69-78.
43. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreassen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*. 2010; 5 (2): 1-10.
44. Shoelson S, Lee J, Goldfine A. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006, 116: 1793-1801.
45. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444 (7121): 860-867.
46. Serino M, Luche E, Chabo C, Amar J, Burcelin R. Intestinal microflora and metabolic diseases. *Diabetes and Metabolism* 2009; 35: 262-272.
47. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; 116: 3015-3025.
48. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86: 1286-1292.
49. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, et al. Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 2272-2279.
50. Deopurkar R, Ghanim H, Friedman J, Abuaysheh S, Sia CL, Mohanty P, et al. Differential effects of cream, glucose and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. *Diabetes Care*. 2010; 33: 991-997.
51. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56: 1761-1772.

52. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009; 58(8): 1091-1103.
53. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*. 2009; 50: 90-97.
54. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87: 1219-1223.
55. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care*. 2009; 32: 2281-2287.
56. Estadella D, Nascimento CM, Oyama LM, Ribeiro EB, Dâmaso AR, Piano A. Lipotoxicity: effects of dietary saturated and trans fatty acids. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 1-13.
57. Allin K, Nielsen T, Pedersen O. Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology*. 2015; 172: 167-177.
58. Vinje S, Stroes E, Nieuwdorp M, Hazen S. The gut microbiome as novel cardio-metabolic target: the time has come! *European Heart Journal*. 2014; 35: 883-887.
59. Gibson GR. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutr*. 1999; 129 (7): 1438-1441.
60. Serino M, Luche E, Chabo C, Amar J, Burcelin R. Intestinal microflora and metabolic diseases. *Diabetes and Metabolism*. 2009; 35: 262-272.
61. Delzenne N, Neyrinck A, Cani P. Gut microbiota and metabolic disorders: how prebiotic can work? *British Journal of Nutrition*. 2013; 109: 81-85.
62. Guarner F, Khan A, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, et al. Probiotics and prebiotics 2011. World Gastroenterology Organisation. Global Guidelines. Disponível em: www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/Probiotics_FINAL_20110116.pdf
63. Holst JJ. The physiology of glucagon-like-peptide 1. *Physiol Rev*. 2007; 87: 1409-1439.
64. Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM, Burcelin R. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*. 2006; 55: 1484-1490.
65. Zhou J, Martin RJ, Tulley RT, Raggio AM, McCutcheon KL, Shen L, et al. Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295: 1160-1166.
66. Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, Naslain D. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90: 1236-1243.
67. Parnell JA, Reimer RA. Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroides and Firmicutes in lean and obese JCR: LA-cp rats. *Br J Nutr*. 2011; 18:1-13.
68. McCarty MF, DiNicolantonio JJ. Acarbose, lente carbohydrate, and prebiotics promote metabolic health and longevity by stimulating intestinal production of GLP-1. *Open Heart*. 2015; 2(1): 1-6.
69. Bharti SK, Krishnan S, Kumar A, Gupta AK, Ghosh AK, Kumar A. Mechanism-based antidiabetic activity of Fructo- and iso-malto-oligosaccharides: Validation by in vivo, in silico and in vitro interaction potential. *Process Biochemistry*. 2015; 50: 317-327.
70. Lecerf JM, Depeint F, Clerc E, Dugenet Y, Niamba CN, Rhazi L, et al. Xylo oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone only shows prebiotic properties. *Br J Nutr*. 2012; 108: 1847-1858.
71. 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 Metab J*. 2013; 37(2): 140-148.
72. Dewulf EM, Cani PD, Claus SP, Fuentes S, Puylaert PG, Neyrinck AM, et al. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*. 2013; 62: 1112-1121.
73. Fallucca F, Porratta C, Fallucca S, Pianesi M. Influence of diet on gut microbiota, inflammation and type 2 diabetes mellitus. First experience with macrobiotic Ma-Pi 2 diet. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014; 30 (1): 48-54.
74. Barengolts, E. Vitamin D and prebiotics may benefit the intestinal microbacteria and improve glucose homeostasis in pre-diabetes and type 2 diabetes. *Endocr Pract*. 2013; 19(3): 497-510.
75. Johanningsmeier SD, Harris, GK. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2011; 2: 181-201.
76. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol*. 2007; 45(4): 454-460.
77. McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, et al. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut*. 2003; 52(7): 975-980.
78. Fukushima Y, Kawata Y, Mizumachi K, Kurisaki J, Mitsuoka T. Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. *Int J Food Microbiol*. 1999; 46(3): 193-197.
79. Al-Salami H, Butt G, Fawcett JP, Tucker IG, Golocorbin-Kon S,

- Mikov M. Probiotic treatment reduces blood glucose levels and increases systemic absorption of gliclazide in diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2008; 33: 101-106.
80. Kumar M, Rakesh S, Nagpal R, Hemalatha R, Ramakrishna A, Sudarshan V, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Aloe vera gel improve lipid profiles in hypercholesterolemic rats. *Nutrition.* 2013; 29: 574-579.
81. Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2010; 64: 636-643.
82. Hulston CJ, Churnside AA, Venables MC. Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects. *British Journal of Nutrition.* 2015; 113: 596-602.
83. Ostadrahimi A, et al. Effect of Probiotic Fermented Milk (Kefir) on Glycemic Control and Lipid Profile In Type 2 Diabetic Patients: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Iran J Public Health.* 2015; 44(2): 228-237.
84. Moroti C, Souza Magri LF, Costa MR, Cavallini DC, Sivieri K. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycaemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids Health Dis.* 2012; 11: 1-8.
85. 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.* 2012; 28: 539-543.
86. Hartstra A, Bouter K., Bäckhed F., Nieuwdorp M. Insights Into the Role of the Microbiome in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2015; 38: 159-165.
87. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008; 57: 1470-1481.
88. Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, Burcelin RG. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *Faseb J.* 2008; 22: 2416-2426.
89. Thuny F, Richet H, Casalta JP, Angelakis E, Habib G, Raoult D. Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. *PLoS One.* 2010; 5(2): 1-6.
90. Hernández E, Bargiela R, Diez MS, Friedrichs A, Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, et al. Functional consequences of microbial shifts in the human gastrointestinal tract linked to antibiotic treatment and obesity. *Gut Microbes.* 2006; 4: 306-315.
91. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med.* 2013; 368: 407-415.
92. Smits LP, Bouter KE, de Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology.* 2013; 145: 946-953.
93. Scott K, Antoine JM, Midtvedt T, Hemert S. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microbial Ecology in Health & Disease.* 2015; 26: 1-10.
94. Smith MB, Kelly C, Alm EJ. Policy: how to regulate faecal transplants. *Nature.* 2014; 506: 290-291.
95. Brandt LJ, Aroniadis OC. An overview of fecal microbiota transplantation: techniques, indications, and outcomes. *Gastrointest Endosc.* 2013; 78: 240-249.
96. Anderson JL, Edney RJ, Whelan K. Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 36: 503-516.
97. Aroniadis OC, Brandt LJ. Fecal microbiota transplantation: past, present and future. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013; 29: 79-84.
98. 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): 913-916.
99. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and Environment Microbiology.* 2000; 66: 1654-1661.
100. Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology.* 2011; 17: 1519-1528.
101. Alang N, Kelly C. Weight gain after fecal microbiota transplantation. *Open Forum Infectious Diseases.* 2015; 2 (2): 1-2.
102. Weil A, Hohmann E. Fecal microbiota transplant: benefits and risks. *Open Forum Infectious Diseases.* 2015; 2 (1): 1-2.
103. Udayappan SD, Hartstra AV, Dallinga-Thie GM, Nieuwdorp M. Intestinal microbiota and fecal transplantation as treatment modality for insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol.* 2014; 177(1): 24-29.