

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

INFLUÊNCIA DA FLORA INTESTINAL
NA
ETIOPATOGENIA E TERAPÊUTICA
DA
DIABETES

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ano Lectivo 2013/2014

Jorge Manuel Trigo Vaz de Romão Lourenço

Porto 2014

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

INFLUÊNCIA DA FLORA INTESTINAL
NA
ETIOPATOGENIA E TERAPÊUTICA
DA
DIABETES

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autoria:

Jorge Manuel Trigo Vaz de Romão Lourenço¹

Orientação:

Dr. Jorge Manuel Dorez²

¹Aluno do sexto ano profissionalizante do Mestrado Integrado em Medicina

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº228 4050-313 Porto

Endereço: jorge.v.lourenco@gmail.com

²Assistente Graduado do Serviço de Endocrinologia do CHP-HGSA

Professor Convidado do Mestrado Integrado em Medicina ICBAS-UP

Afiliação: Serviço de Endocrinologia Hospital Geral de Santo António /

Centro Hospitalar do Porto / Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Univ.do Porto

Lista de Abreviaturas

AGCCs – Ácidos gordos de cadeia curta

AngII – Angiotensina II

APC – Células apresentadoras de antígenos

CEI – Células do epitélio intestinal

DM – Diabetes mellitus

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

FIAF – Fator adipocitário induzido pelo jejum

GLP – *Glucagon-like peptide*

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

HLA – *Human Leukocyte Antigen*

IFN – *Interferon*

IL – Interleucina

Ig – Imunoglobulina

JNK – *Jun N-terminal*

LPS – Lipopolissacarídeo

MALT – *Mucosal-associated lymphoid tissue*

MAMP – *Microbial Associated Molecular Pattern*

MyD88 – Fator 88 de diferenciação mielóide

NOD – *Non-obese diabetic*

NOD1 – *Nucleotide Oligomerization Domain*

Nor – Noradrenalina

PYY – Peptídeo YY

RELM-β – *Resistin-like molecule β*

ROS – Espécies reativas de oxigénio

rRNA – RNA ribossómico

SFA – Ácidos gordos saturados

SFB – Bactérias filamentosas segmentares

SNC – Sistema Nervoso Central

Th – *T helper*

TFA – Ácidos gordos trans

TNF – Fator de necrose tumoral

TLR – *Toll-like receptor*

UFC – Unidade formadora de colónias

Lista de Figuras

Figura 1 – Papel imunorregulador das bactérias filamentosas segmentares.....	16
Figura 2 – Resumo da <i>Perfect Storm Hypothesis</i>	20
Figura 3 – Mecanismo de ação dos probióticos.....	21
Figura 4 – Resumo da Teoria do Armazenamento.....	25
Figura 5 – Mecanismo de ação dos prebióticos.....	30

Resumo

O trato gastrointestinal humano alberga de forma natural um grupo diverso e heterogêneo de microrganismos também denominado microflora.

A microflora intestinal tem a capacidade de estabelecer uma relação fisiológica, mutualista e equilibrada com o ser humano (hospedeiro), desempenhando várias funções, não só ao nível da digestão e absorção dos nutrientes provenientes da dieta, como também no que concerne à manutenção da integridade do sistema imunitário.

Contudo, uma alteração na composição da microflora pode contribuir para o desenvolvimento de “disbiose”, isto é, a interação microflora-hospedeiro pode tornar-se instável e nociva, podendo associar-se ao aparecimento de várias doenças.

A disbiose intestinal parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2, na medida em que contribui para o aparecimento de um estado de autoimunidade e disfunção metabólica, respectivamente.

Esta revisão bibliográfica pretende expor a mais recente evidência científica publicada, relativamente aos mecanismos patogénicos potenciados pela microflora intestinal no desenvolvimento da diabetes.

O conhecimento destes mecanismos permitirá explorar as alternativas terapêuticas disponíveis (aprovadas ou ainda em investigação) capazes de restaurar a saúde do hospedeiro (recuperação da tolerância à glicose e da insulinosensibilidade), através da reversão do estado de disbiose e da normalização do perfil microbiano intestinal.

Atualmente, surge um crescente interesse científico na aplicação terapêutica de prebióticos, probióticos e nos potenciais benefícios do transplante fecal; contudo, ainda não existem dados suficientes que permitam afirmar ou refutar a sua viabilidade no tratamento da diabetes.

Palavras-chave: diabetes mellitus, microflora, microbioma, autoimunidade, obesidade, insulinoresistência, prebióticos, probióticos, transplante fecal

Abstract

The human gastrointestinal tract is colonized by a diverse and heterogenic group of organisms also known as microbiota, which has the ability to establish a balanced, mutualistic and physiologic interaction with the host (humans).

The intestinal microbiota represents an important player in digestive functions as well as in immune regulation; however, an alteration in the “normal” microbial profile can negatively modulate the natural host responses, increasing the risk of developing disease.

This vicious interaction is called dysbiosis and there’s evidence that it can be involved in immune deregulation as well as in metabolic dysfunction.

Therefore, it seems the state of dysbiosis may contribute to the development of type 1 and 2 diabetes mellitus.

This review will examine the role of intestinal microbiota in the pathogenesis of diabetes, as well as the therapeutic impact of microbial modulation strategies on glucose tolerance and insulin sensitivity.

Nowadays, there’s been published interesting data regarding not only the use of pre- and probiotics, but also the potential benefits of completely new procedures like fecal transplant. Unfortunately, new evidence is needed in order to confirm or refute the viability of these new strategies regarding the treatment of diabetes.

Key-words: *diabetes mellitus, microbiota, microbiome, immune deregulation, obesity, insulin resistance, prebiotics, probiotics, fecal transplant*

Índice

Influência da Microflora Intestinal na Etiopatogenia e Terapêutica da Diabetes

1. Introdução	8
2. Mutualismo ecológico microflora – hospedeiro	9
3. Microflora intestinal e diabetes mellitus tipo 1 (DM1)	13
3.1. Relação microflora - autoimunidade	13
3.1.1. Imunidade inata	13
3.1.2. Imunidade adaptativa	15
3.2. Microflora e diabetogenicidade	17
3.2.1. Parto por cesariana	18
3.2.2. Infecções víricas	18
3.2.3. Alterações dietéticas	18
3.2.3.1. Exposição precoce a proteínas do leite da vaca	19
3.2.3.2. Gliadina	19
3.2.3.3. Caseína hidrolisada	20
3.3. Terapêutica – modulação da microflora	21
3.3.1. Probióticos	21
3.3.2. Antibioterapia	23
4. Microflora intestinal e diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	24
4.1. Relação microflora - obesidade	24
4.2. A “endotoxemia metabólica”	28
4.3. Terapêutica – modulação da microflora	29
4.3.1. Prebióticos	29
4.3.2. Probióticos	32
4.3.3. Antibioterapia	32
4.3.4. Transplante Fecal	33
5. Conclusão	34
Referências Bibliográficas	35

1. Introdução

A diabetes mellitus (DM) representa um dos distúrbios metabólicos com maior impacto na saúde da população mundial. Esta é considerada uma das grandes epidemias do século XXI (sobretudo a DM tipo 2), marcada por uma evolução epidemiológica galopante: em 1985 foram contabilizados 30 milhões de casos na população mundial, número que evoluiu rapidamente para 135 milhões em 1995 e 240 milhões em 2005. (1)

A *International Diabetes Federation* estima que existam 175 milhões de pessoas com diabetes não diagnosticada e prevê que em 2035 existam 592 milhões de diabéticos em todo o mundo.(2) De facto, estes números acarretam um impacto eminentemente negativo da DM na saúde das populações; além de ser preponderante no desenvolvimento de patologia cardio e cerebrovascular, esta é também apontada como a principal causa de cegueira, insuficiência renal e amputação dos membros inferiores. (2)

A DM tipo 2 (DM2) corresponde ao subtipo da doença com maior expressão populacional, pelo que programas de prevenção e controlo efetivos são fundamentais para evitar que a sua prevalência global continue a aumentar. (3)

Dada a importância da susceptibilidade genética, dos estímulos ambientais e imunológicos na patogénese da diabetes e noutros distúrbios a ela associados, nomeadamente a obesidade, tem surgido um crescente interesse por parte da comunidade científica em esclarecer o papel desempenhado por um agente potencialmente capaz de intervir nesses três níveis: a microflora intestinal. (3)

De facto, o microbioma (coleção genómica da microflora) intestinal é significativamente mais extenso do que o genoma humano e encerra importantes funções biológicas e metabólicas ainda não totalmente conhecidas. (4)

O microbioma do intestino humano tem sido alvo de inúmeros estudos de modo a obter um maior esclarecimento sobre o papel da microflora na manutenção da integridade intestinal.

Uma das vantagens deste tipo de investigação é a capacidade de identificar diferenças no perfil funcional da microflora intestinal entre indivíduos saudáveis e aqueles com diabetes mellitus. (4)

A presente dissertação visa a abordagem dos recentes avanços científicos publicados sobre esta matéria, destacando o impacto da microflora intestinal no desenvolvimento da obesidade, insulinoresistência e fenómeno autoimune (associado à DM tipo 1), bem como o potencial terapêutico das estratégias de modulação microbiana intestinal.

2. Mutualismo ecológico 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.

Estes microrganismos são fundamentalmente bactérias e colonizam vários tecidos do organismo humano; a maior população bacteriana está localizada no trato gastrointestinal, concretamente no cólon, onde se identificam quatro *Fila* principais: *Firmicutes* (inclui espécies de *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Clostridium*), *Bacteroides*, *Actinobacteria* (inclui o género *Bifidobacterium*) e *Proteobacteria*; os 2 primeiros são os *Fila* dominantes. (5)

A grande maioria destas bactérias é anaeróbia e capaz de se comportar como patogéneo oportunista. (6) O intestino humano é estéril durante o desenvolvimento fetal *in-utero* e, ao nascimento, a passagem pelo canal do parto dá início ao fenómeno de colonização. (6)

Imediatamente após o nascimento, a flora intestinal do bebé vai sendo modulada pela exposição a bactérias ambientais oriundas da pele, do leite materno, etc., atingindo a sua maturidade nos primeiros 2 anos de vida (idade de transição de uma dieta baseada na amamentação e de alto teor lipídico para uma dieta rica em hidratos de carbono. (7, 8)

Durante a infância as espécies de *Bifidobacterium* são os principais colonizadores intestinais. (8) À medida que o indivíduo se aproxima da idade adulta, a composição microbiana intestinal vai evoluindo de acordo com certos estímulos ambientais, designadamente a dieta alimentar. (9)

Na população idosa assiste-se a um aumento da proporção de *Bacteroides* e de *Clostridium*. (10) Em geral, apesar de variações inter-individuais na composição da flora intestinal, esta estabelece um equilíbrio naturalmente estável com o ser humano (hospedeiro).

Durante a maior parte da idade adulta, o perfil populacional da flora intestinal sofre alterações pouco significativas, explicadas parcialmente pela prolongada exposição do sistema imune do hospedeiro às bactérias que compõem a microflora, sendo identificadas pelo hospedeiro como “inofensivas”. (11)

Neste sentido, o desenvolvimento normal da flora intestinal fica marcado por uma estabilidade intra-hospedeiro e, simultaneamente, uma variabilidade inter-hospedeiro, esta última influenciada de forma considerável pelo ambiente.

Alguns investigadores propõem um modelo classificativo bacteriano em que se agrupam em “enterótipos” espécies colonizadoras que respondem de modo semelhante a determinados estímulos ambientais. (12)

Neste contexto, a dieta alimentar é um dos principais vectores ambientais, capaz de influenciar a proporção das diferentes espécies bacterianas que compõem a flora, condicionando a diversidade funcional da flora intestinal.

Por outro lado, estes microrganismos são também um dos protagonistas envolvidos no fenómeno digestivo:

a) Absorção de hidratos de carbono de origem vegetal (sem estas bactérias os mesmos não seriam digeríveis) (13)

b) Síntese de vitaminas (biotina, vitamina K, ácido fólico (14)

c) Conversão de proteínas lácteas em ácido láctico (função desempenhada pelas espécies de *Lactobacillus* que compõem a flora) (15)

d) Metabolismo de produtos potencialmente nocivos (ácidos biliares, bilirrubina, colesterol, aminas heterocíclicas e oxalato) (16)

e) Degradação e fermentação de polissacarídeos, transformando-os em ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs) (16)

Esta ocorre no cólon e origina os seguintes AGCCs: acetato (C3) propionato (C4) e butirato (C5). (17)

Estas moléculas são então absorvidas no cólon, estimulando a absorção cólica de água e sódio e contribuindo para mais de 10% das necessidades calóricas do hospedeiro. (18)

Os AGCCs podem comportar-se como ligandos de receptores existentes à 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. (19)

Uma das propriedades comum aos três AGCCs mencionados consiste no seu efeito anti-inflamatório: o acetato e propionato atuam na via inflamatória mediada por receptores acoplados a proteínas G (expressos em células envolvidas na imunidade inata, como neutrófilos) (20), enquanto o butirato inibe o fator de transcrição NF- κ B e, consequentemente, mediando a atividade de citocinas pró-inflamatórias. (21)

O butirato é produzido por *Firmicutes* (22) e satisfaz cerca de 60-70% das necessidades energéticas dos colonócitos, sendo responsável indiretamente por importantes benefícios ao nível da integridade da barreira intestinal, reparação epitelial, produção de mucina e, conseqüentemente, a prevenção de doenças (23), incluindo neoplasias (indução de apoptose e inibição da proliferação de células tumorais). (24)

Este modelo de mutualismo ecológico flora-hospedeiro estende-se para além do fenómeno digestivo; a flora intestinal exerce outras funções que beneficiam o ser humano, designadamente:

a) Inibição do crescimento de agentes patogénicos: a “resistência à colonização” consiste na competição entre os saprófitas e os agentes externos em termos de adesão à mucosa intestinal e consumo dos recursos disponíveis, produção de substâncias anti-microbianas e estimulação do sistema imune pelos agentes saprófitas. (25)

Este fenómeno também permite controlar a atividade de certos agentes da flora potencialmente nocivos. Um exemplo corresponde ao *Clostridium difficile*, presente numa minoria de adultos assintomáticos; assim, perante a interrupção da atividade reguladora exercida pelos restantes saprófitas da flora (uso de antibioterapia de largo espectro, nomeadamente macrólidos) esta bactéria deixa de ver a sua atividade inibida e pode desenvolver colite. (26)

b) Modulação do sistema imune do hospedeiro: Verificou-se em estudos animais que a espécie *Bacteroides fragilis* e aquelas do Filo *Firmicutes* promovem a acumulação de células T reguladoras na mucosa cólica, prevenindo o desenvolvimento de processos inflamatórios locais (colite). (27)

c) Manutenção da barreira epitelial intestinal (turnover epitelial intestinal); metabolismo de fármacos; angiogénese (28)

d) Desenvolvimento cerebral: Alguns investigadores verificaram que a colonização intestinal estimula o desenvolvimento de mecanismos de sinalização capazes de afectar circuitos neuronais responsáveis pelo controlo da atividade motora e ansiedade. (29)

Ao longo dos últimos anos tem-se assistido a um maior esclarecimento da complexa interação flora-hospedeiro recorrendo sobretudo a métodos biomoleculares, capazes de analisar um amplo espectro bacteriano, incluindo bactérias da flora difíceis de cultivar em laboratório. A sequenciação genética do 16SrRNA bacteriano aplicada em amostras da mucosa intestinal (biópsia) e de matéria fecal é uma das técnicas mais usadas na identificação filogenética da flora intestinal. (30)

O programa *Human Microbiome Project* consiste numa das mais importantes bases de dados metagenómicas. (31) Por um lado, permitiu conhecer em pormenor, quer do ponto de vista genómico quer taxonómico, a população de microrganismos que habitam o organismo humano. (32) Por outro lado, contribuiu para uma melhor compreensão do seu papel no processo fisiopatológico de algumas doenças, nomeadamente a diabetes. (32)

3. Microflora intestinal e diabetes mellitus tipo 1

3.1. Relação microflora – autoimunidade

A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) decorre da destruição autoimune das células β do parênquima pancreático, fenómeno mediado por linfócitos T e responsável pelo desenvolvimento de um estado insulinopénico de evolução gradual e irreversível. (33)

Esta doença é geralmente diagnosticada em crianças, adolescentes ou jovens adultos. (34)

Bingley e colaboradores (2008) referem que até 20% dos adolescentes diagnosticados com DM1 eram simultaneamente insulinoresistentes (35); esta sobreposição natural entre DM1 e DM2 está documentada (36-39) e poderá contribuir para acelerar o fenómeno autoimune subjacente. (40)

O fenómeno imunopatológico característico da DM1 está intimamente relacionada com a susceptibilidade genética de um individuo (41-44), traduzindo-se na presença de células T auto-reactivas em circulação, como consequência de alterações no processo de maturação e seleção linfocítica no timo. (45, 46) Esta associação foi comprovada desde cedo em estudos envolvendo gémeos monozigóticos descendentes de pais com DM1 (concluiu-se existir um risco de doença igual a 50%). (47)

Vários investigadores conseguiram, nos últimos anos, identificar vários fatores genéticos que predis põem a DM1, designadamente polimorfismos no complexo HLA (*Human Leukocyte Antigen*) (48) e no gene da insulina. (49)

3.1.1. Imunidade inata

O desenvolvimento da imunidade inata está relacionado com a atividade das células do epitélio intestinal (CEI), cuja integridade poderá depender da microflora. (50)

O epitélio intestinal contém *tight junctions* que regulam a passagem de nutrientes e inibem a translocação de agentes patogénicos. (50)

A imunidade inata é protagonizada por vários elementos celulares e moleculares, nomeadamente os *Toll-like receptors* (TLRs), que asseguram o reconhecimento da flora comensal e controlam a sua atividade. (51)

As CEIs intervêm no processamento e apresentação de antígenos, interagindo diretamente com células do sistema imune, não só células dendríticas como também células TCD8 e Treguladoras, tendo também a capacidade de produzir e responder à ação de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10) que modulam a atividade das células dendríticas. (52)

Um epitélio intestinal disfuncional poderá relacionar-se com alterações na composição microbiana intestinal capazes de aumentar a permeabilidade intestinal, com consequente desregulação da resposta imune local. (52)

A avaliação do desenvolvimento imune e integridade intestinal de ratos assépticos mostrou que estes animais apresentam uma redução não só no tamanho e número de placas de Peyer, como também dos centros germinativos esplênicos e gânglios linfáticos mesentéricos. Além disso, foi reportado um deficiente desenvolvimento do MALT (*mucosal-associated lymphoid tissue*) - sobretudo células TCD4 – (53) e ainda uma menor produção de fatores antimicrobianos (ex: RegIIIγ - específico para bactérias Gram positivas). (54) A recolonização intestinal destes ratos promoveu a normalização do tamanho e celularidade das estruturas linfóides, bem como o aumento da produção de anticorpos (51, 55)

Vários estudos com animais revelaram que uma menor produção das proteínas claudina-1 e zonulina associa-se a uma menor atividade das *tight junctions* das CEIs, traduzindo-se num aumento da permeabilidade intestinal e num maior risco de desenvolver DM. (56-58)

Wen e colaboradores (2008) procuraram avaliar o papel imunorregulador de um adaptador molecular presente em múltiplos TLRs, o fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88) que auxilia na regulação da resposta imune inata. (59)

Neste estudo, verificou-se um desenvolvimento mais rápido de DM1 em ratos assépticos que não expressam este adaptador. (59)

Os ensaios em humanos realizados até ao momento revelaram uma acentuada permeabilidade intestinal em indivíduos com DM1, prévia ao aparecimento de sintomatologia. (60-63)

Pensa-se que na DM1 exista uma tendência para uma maior expressão de genes relacionados com a motilidade e adesão celulares. (64)

O intestino delgado de indivíduos com DM1 parece estimular a expressão de HLA-DR. (65) Foi ainda relatada uma maior percentagem de células IL-1α+ e IL-4+, reforçando a relação entre a DM1 e um estado inflamatório intestinal subjacente. (66)

Por outro lado, a avaliação do 16sRNA bacteriano de indivíduos com DM1 mostrou uma reduzida população de bactérias que degradam mucina e produzem butirato, anteriormente referidas como promotores da integridade do epitélio intestinal. (64)

Pensa-se que existe uma correlação negativa entre espécies de *Lactobacillus* e o desenvolvimento de DM1, designadamente *L. johnsonii* e *L. ruteri*, sendo o primeiro um promotor da expressão de claudina-1 e protetor da mucosa ileal (diminui o stress oxidativo local e os níveis de interferon- γ (IFN γ)). (67)

3.1.2. Imunidade adaptativa

Vários investigadores referem que as células apresentadoras de antígenos - APC (ex: macrófagos; células dendríticas) - são as primeiras a infiltrar-se no parênquima pancreático. (68)

Estas células passam pelos gânglios linfáticos locais, interagindo com células TCD4+/Th (*T helper*) auto-reactivas aí presentes. O seu aparecimento decorre de uma disfunção tímica de cariz genético com eliminação ineficaz de células T ditas “anormais”. (68)

A interação APC-TCD4+ resulta na sua diferenciação em células Th1 com especificidade para os antígenos pancreáticos. (69) O fenómeno imunopatológico da DM1 baseia-se na infiltração pancreática de células Th1 auto-reactivas; a consequente lesão pancreática aumenta a ativação das células T e a sua exposição aos antígenos dos tecidos do hospedeiro. (70)

Uma resposta exacerbada das células Th1 traduz-se numa maior produção de citocinas que interagem com células TCD8+, estas últimas responsáveis pelo processo de destruição das células β pancreáticas. A intervenção das células TCD8+ é decisiva para o desenvolvimento do estado de insulinopenia e para a apresentação clínica da DM1. (71)

Um outro subtipo de células TCD4+ corresponde às células Th17, presentes sobretudo no intestino (72) e responsáveis pela secreção de uma citocina com atividade anti-microbiana:

IL-17. Pensa-se que a atividade destas células seja regulada pela microflora intestinal. (73)

A IL-17 induz a libertação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6; IL-8, etc.), estando também implicada noutras doenças autoimunes que não a DM1, nomeadamente doença inflamatória intestinal e psoríase. (74)

Pensa-se que a regulação da imunidade adaptativa dependa, tal como a imunidade inata, da microflora intestinal; nesse contexto, esta poderá intervir no controlo da proliferação de células Treguladoras e na atividade de células Th17. (75)

As células Treguladoras asseguram a tolerância imune aos antígenos orais e comensais (76), promovem a secreção de citocinas anti-inflamatórias (ex: IL-10; TGF- β) e a modulação da atividade das células TCD4+ e dos seus subtipos (Th1, Th2, Th17, etc.). (77)

Neste sentido, a existência de alterações no número e função destas células poderá contribuir para o desenvolvimento de DM1. (78)

Existem estudos publicados que revelam que ratos assépticos apresentam uma reduzida atividade de células B (menor produção de IgA) e células Treguladoras (menor libertação de IL-10). (79) A colonização intestinal destes ratos com *B. fragilis* - espécie produtora de um polissacarídeo A (promove a conversão de células TCD4+ em células Treguladoras), amplia a libertação de IL-10 e, consequentemente, intensifica a sua atividade supressora. (80) Em ratos com DM1 verificou-se uma atividade descontrolada das células Th1 e Th2. (81)

O estudo do perfil funcional da flora intestinal revelou que *Bacteroides* reduzem a inflamação intestinal (82) enquanto as bactérias filamentosas induzem a ativação de células Th17 (83) - ver **Figura 1**. (84) Lau e colaboradores (2011) (85) estudaram os efeitos imunológicos após colonização de ratos com *L. johnsonii*, tendo verificado não só um aumento da atividade das células Th17, como também um atraso no desenvolvimento de DM1. (85)

Esta aparente contradição ainda não está totalmente esclarecida, o que obriga a uma maior clarificação deste fenómeno.

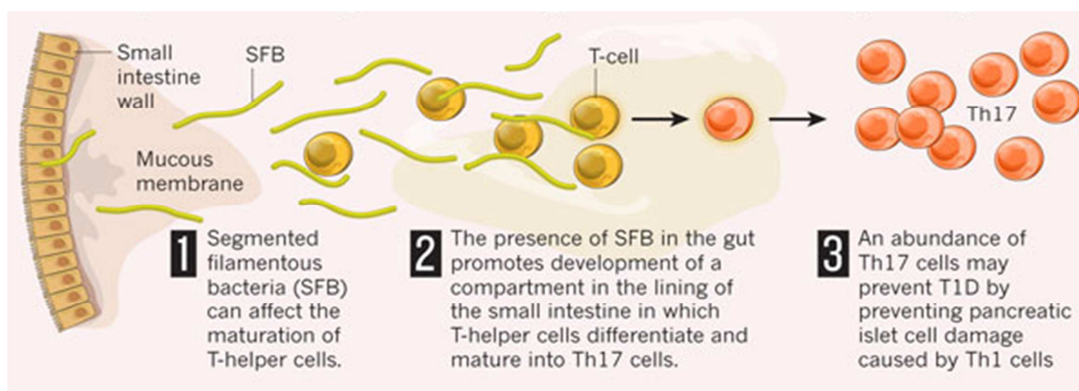


Figura 1. Papel imunorregulador das bactérias filamentosas segmentares (Adaptado de Gravit L, 2012)

SFB – Bactérias filamentosas segmentares

O estudo da imunidade adaptativa na DM1 e a sua relação com a microflora intestinal é ainda pouco expressivo em ensaios humanos. Contudo, é expectável que os resultados alcançados sejam semelhantes àqueles obtidos em modelos animais. (86)

A avaliação histológica de tecido pancreático de cadáveres com antecedentes de DM1 verificou-se um infiltrado celular nos ilhéus pancreáticos, composto sobretudo por macrófagos e células TCD8+. (87)

Um estudo envolvendo biópsias de intestino delgado de crianças com DM1 revelou que estas apresentavam um número reduzido de células Treguladoras Foxp3+. (88)

3.2. Microflora intestinal e diabetogenicidade

Nos últimos 50 anos tem-se verificado o aparecimento da DM em populações com um genótipo de “baixo risco”, o que vem reforçar a importância de elementos ambientais, nomeadamente a microflora intestinal, no processo patogénico da DM1. (89)

Vários estudos constataram alterações na sua composição em indivíduos com DM1.

Em modelos animais, a hibridização *in situ* de uma amostra fecal de ratos com DM1 revelou um domínio de *Bacteroides* sobre *Lactobacillus*, bem com um aumento das populações de *Eubacterium* e *Ruminococcus* em comparação com o grupo controlo. (67)

O perfil microbiano de amostras fecais de crianças com DM1 revelou, nomeadamente, um incremento populacional de *Clostridium*, *Bacteroides* e *Veillonella*, bem como uma redução na contagem de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Blautia* *coccoides*. (90, 91)

O incremento populacional de *Prevotella* foi também observado em crianças mexicanas com DM1 em comparação com o grupo controlo. (92)

Neste sentido, pensa-se que nos indivíduos com DM1 exista uma menor quantidade de bactérias protetoras da integridade intestinal e que os níveis de *Clostridium* se correlacionem positivamente com o perfil glicémico desses doentes. (90)

Por outro lado, uma investigação aplicada em crianças com DM1 baseada na amplificação de 16sRNA bacteriano revelou um aumento da proporção de *Bacteroides* (destacando-se *B. ovatus*) e uma diminuição de *Firmicutes*. (93)

Apesar dos resultados promissores obtidos em estudos como o TEDDY (*The Environmental Determinants of Diabetes in Young*), é fundamental aprofundar o conhecimento sobre este tema. (94)

O potencial diabetogénico está relacionado com uma modulação negativa da flora intestinal, que se traduz na promoção do desenvolvimento populacional de certas espécies bacterianas ditas “diabetogénicas” em detrimento de outras.

A modulação microbiana pode ser influenciada por vários fatores, designadamente:

3.2.1. Parto por cesariana

Cardwell e colaboradores (2008) verificaram que crianças nascidas via cesariana apresentam maior risco para desenvolver diabetes tipo 1 do que aquelas nascidas por parto vaginal, decorrente não só do microbioma intestinal inicial das crianças nascidas por cesariana, dominado por agentes comensais da pele (*S.aureus*), como também de uma colonização intestinal mais lenta. (95)

3.2.2. Infecções Víricas

A influência das infeções víricas na patogénese da DM1 começou a ser alvo de estudo desde há 40 anos, quando se observou uma correlação positiva entre as variações sazonais do início da DM1 e as infeções por enterovirus. (96)

Apesar de alguma discordância entre a evidência disponível, (97) pensa-se que os enterovirus, nomeadamente o Coxsackie vírus (98), poderão intensificar a resposta inflamatória intestinal e, conseqüentemente, predispor à autoimunidade pancreática. (99)

3.2.3. Alterações Dietéticas

Hoorfar e colaboradores (1993) apresentaram um dos estudos pioneiros sobre a relação entre a dieta e o fenómeno autoimune característico da DM1. (100)

Posteriormente, novos estudos vieram mostrar que a integridade intestinal é regulada pelos microrganismos comensais do intestino e, por sua vez, a composição da flora depende da qualidade e quantidade do aporte nutricional do hospedeiro. (101)

Esta tripla interação é importante sobretudo em idades precoces, devido ao processo de desenvolvimento e maturação da resposta imunológica do hospedeiro. (101)

3.2.3.1. Exposição precoce a proteínas do leite de vaca (PVL)

Vaarala e colaboradores (1999) verificaram que bebês com menos de 3 meses de idade alimentados por leite de fórmula contendo PVL desenvolvem uma baixa tolerância imune contra a insulina bovina; a semelhança estrutural entre esta e a insulina humana (difere em apenas 3 aminoácidos) torna possível a ocorrência de reações cruzadas em indivíduos geneticamente susceptíveis, aumentando o risco de DM1. (102)

3.2.3.2. Gliadina

Um dos componentes dietéticos mais estudados tem sido a gliadina, uma glicoproteína com efeitos nocivos sobre o intestino delgado na doença celíaca, estando também envolvida no processo de integridade do epitélio intestinal, contribuindo para uma menor crescimento de bactérias aeróbias e microaerofílicas. (103, 104)

Pensa-se que a gliadina exerça um papel pró-inflamatório e aumente a permeabilidade intestinal (105), uma vez que:

- 1) Células dendríticas pancreáticas, após reconhecerem a gliadina, promovem ativação das células T (aumenta risco de apoptose das células β) (106)
- 2) Há aumento da proporção de células Th1 face às células Th2 nos gânglios linfáticos do mesentério (107)
- 3) Há supressão da produção de células T reguladoras (108)

Um estudo envolvendo biópsias de jejuno de indivíduos com DM1 verificou o desenvolvimento de uma resposta inflamatória após exposição *in vitro* a gliadina. (109)

As espécies bacterianas *E.coli* e *Shigella* podem potenciar o efeito da gliadina. (110)

Esta ação sinérgica poderá traduzir-se numa diminuição do número de células caliciformes no intestino delgado e o aumento dos níveis circulantes de interferon- γ (IFN- γ). (110)

Modelos animais envolvendo ratos NOD (*non-obese diabetic*) com regime alimentar sem glúten (ausência de gliadina), relataram uma menor incidência de DM1 em comparação com ratos alimentados com dieta normal. (111)

A espécie bacteriana *Bifidobacterium longum* poderá atenuar a resposta inflamatória intestinal induzida por peptídeos derivados de gliadina. (112)

3.2.3.3. Caseína Hidrolisada

Existem alguns modelos animais que relataram uma diminuição na incidência de DM1 com a introdução de uma dieta baseada em caseína hidrolisada; o seu efeito modulador do microbioma intestinal não está totalmente esclarecido. (113)

Vários investigadores têm procurado explicar de que forma a modulação da microflora intestinal influencia o desenvolvimento de DM1; a base para a construção desses modelos consiste na “*Hygiene Hypothesis*”.

Esta teoria sugere que uma reduzida exposição a microrganismos durante a infância (sejam eles patogénicos ou comensais) conduz a uma menor tolerância imune a antígenos do próprio organismo. (114)

Uma das teorias mais recentes consiste na “*Perfect Storm Hypothesis*” - resumida na **Figura 1** (115) - que reconhece 3 componentes na patogénese da DM1: **microflora intestinal**, **distúrbios genéticos** (traduzem-se numa desregulação imune da mucosa intestinal) e **aumento da permeabilidade intestinal**. (115) Esta teoria é suportada por alguns investigadores que reportaram uma maior permeabilidade intestinal em ratos NOD (*non-obese diabetic*) infectados pela enterobactéria *Citrobacter rodentum*. (116) Existe ainda evidência científica que suporta o teórico papel imunorregulador da microflora intestinal em tecidos extraintestinais. (117, 118)

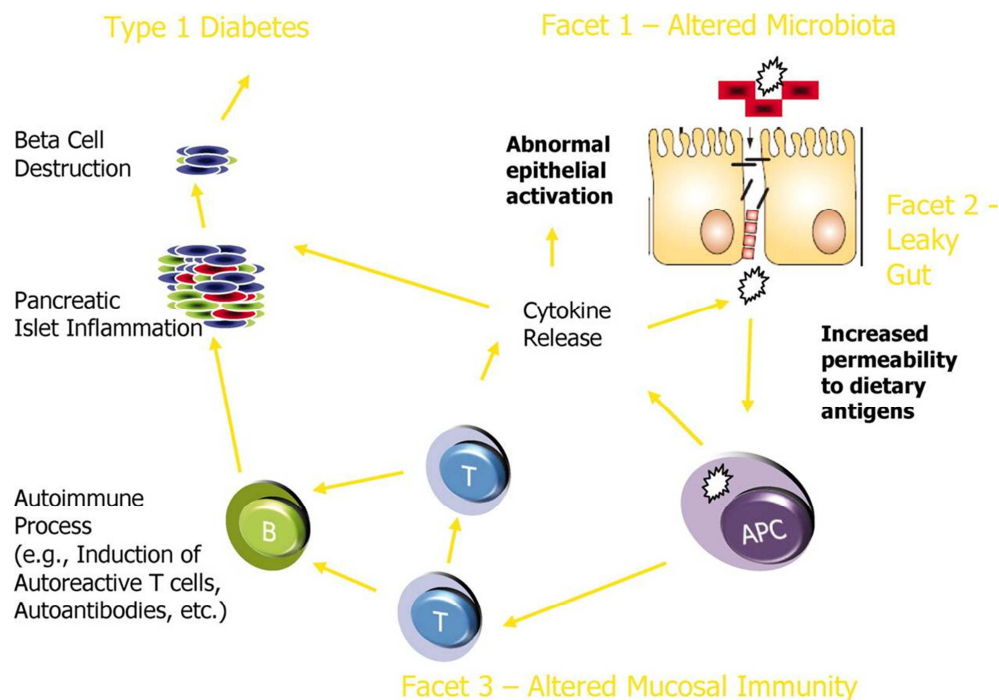


Figura 2. Resumo da *Perfect Storm Hypothesis* (Adaptado de Vaarala et al. 2008)

APC – células apresentadoras de antígenos

3.3. Terapêutica – Modulação da microflora

A irreversibilidade do processo fisiopatológico característico da DM1 tem condicionado o interesse científico em novas estratégias terapêuticas.

Neste contexto, os estudos publicados até ao momento remetem a discussão para a o potencial preventivo da modulação microbiana intestinal.

O potencial terapêutico dos moduladores microbianos ainda não está totalmente esclarecido e, portanto, torna-se fundamental prosseguir com novos ensaios de modo a confirmar a sua viabilidade.

3.3.1. Probióticos

Os probióticos consistem em suplementos microbianos vivos que, quando ingeridos, afectam de modo benéfico saúde do hospedeiro. (119)

De um modo geral, estes agentes interagem com a mucosa intestinal, estimulando mecanismos imunológicos (ex: ativação macrofágica e regulação da produção de citocinas) e não imunológicos (ex: produção de mucina, remoção de espécies reativas de oxigénio) – **Figura 3.** (120) Estes são habitualmente comercializados na forma de preparações farmacêuticas (ex: cápsulas ou saquetas solúveis) ou naturais (ex: iogurte; leite fermentado ou em pó), sendo que no primeiro caso a liofilização do produto mantém a sua viabilidade mesmo em armazenamento à temperatura ambiente.

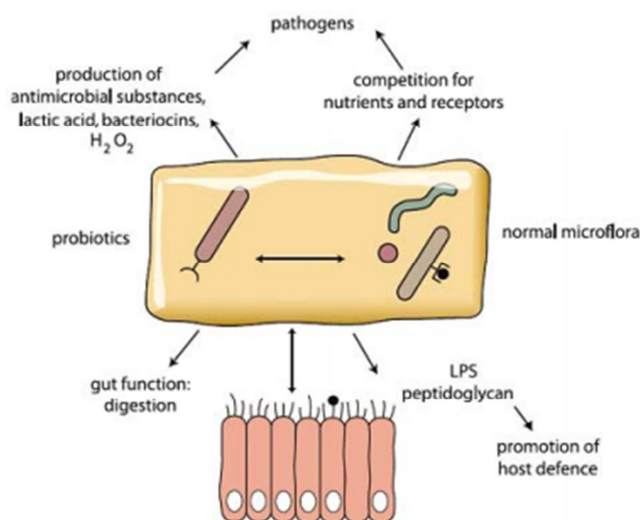


Figura 3. Mecanismo de ação dos probióticos (Adaptado de Sullivan e Nord, 2005)

H_2O_2 – Peróxido de Hidrogénio, LPS – Lipopolissacarídeo

Os microrganismos mais comumente usados como probióticos pertencem sobretudo aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Entre os produtos alimentares com potencial probiótico é possível destacar os iogurtes *Activia* e *Actimel* da Danone (contêm *B. animalis* e *L. casei*, respectivamente) e o leite fermentado *Bifiene* da Yakult (contém *B. breve*). (121)

A informação disponibilizada na literatura até ao momento vem corroborar o impacto positivo destes agentes na prevenção da DM1 (122), nomeadamente no controlo da concentração de ácidos biliares. (123)

Neste sentido, a escolha das espécies probióticas poderá basear-se na eficácia e na sua tolerabilidade ao pH e à bile; de acordo com esses parâmetros há a destacar espécies como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*. (124)

A administração de *Lactobacillus casei* em ratos com diabetes induzida pelo aloxano aumentou a sua sobrevida (125); por outro lado, a aplicação do mesmo probiótico em ratos NOD potenciou a diminuição dos níveis de óxido nítrico e do número de células TCD8⁺ esplénicas, inibindo o desenvolvimento da doença. (126)

Por outro lado, a administração de um complexo probiótico rico em *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* e *Streptococci* em ratos NOD induziu a expressão de IL4 e IL-10 nas placas de Peyer, baço e pâncreas, o que contribuiu para atenuar o processo inflamatório, diminuindo o grau de destruição das células β e, conseqüentemente, reduzindo o ritmo de progressão da doença. (127)

Mais recentemente, ratos tratados com probióticos revelaram uma maior expressão de IL-2, o que poderá traduzir-se num maior controlo das células Treguladoras FoxP3. (128) Pensa-se que a exposição intestinal a *Lactobacillus plantarum* induz a formação de novas *tight-junctions*, o que sugere que este microrganismo poderá desempenhar um importante papel na integridade intestinal. (129)

A evidência científica recolhida em estudos humanos que versam sobre o impacto terapêutico de probióticos na DM1 é ainda diminuta.

O estudo PRODIA, ainda em curso, realizado na Finlândia, procura não só investigar a susceptibilidade genética de crianças em desenvolver DM1; como também averiguar o impacto da utilização de probióticos no controlo de produção de auto-anticorpos. (130)

Joseph Neu e colaboradores da Universidade da Flórida aguardam financiamento para comercializar um novo suplemento probiótico de *Lactobacillus* que criaram com o objectivo de prevenir e atrasar a progressão da DM1. (131)

Importa referir que não há ainda um consenso sobre a dose recomendada para se obter o efeito anti-diabetogénico desenvolvido por estes produtos. Teoricamente admite-se que a população intestinal desse microrganismo deva ser no mínimo de 10⁷ unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g) para que o efeito terapêutico se verifique. (132)

3.3.2. Antibioterapia

Os antibióticos foram outra solução terapêutica estudada para estes doentes.

Ainda que o seu uso produza um efeito teoricamente antagónico – eliminação dos agentes comensais intestinais com aumento do risco de desregulação imune intestinal – alguns investigadores usaram modelos animais para estudar o seu impacto metabólico.

Brugman e colaboradores (2006) analisaram a composição microbiana intestinal antes e após a administração de esquema antibiótico (sulfametoxazol-trimetoprim + colistina) em ratos geneticamente susceptíveis a desenvolver DM. (113)

Estes reportaram uma redução significativa na população de *Clostridium* e *Lactobacillus* após o tratamento; a incidência de DM em ratos com dieta normal e submetidos a antibioterapia diminuiu significativamente (37,5%, comparativamente a 86% do grupo controlo). Curiosamente, quando se introduziu caseína hidrolisada na dieta, nenhum dos ratos submetidos a antibioterapia desenvolveu DM. (113)

Ainda não existem ensaios em humanos que procurem explorar o impacto da antibioterapia no perfil microbiano intestinal de indivíduos diabéticos, bem como os seus efeitos no metabolismo da glicose. Contudo, a discussão científica deverá continuar, equacionando os riscos e benefícios desta modalidade, de modo a que se possa confirmar ou refutar a sua viabilidade terapêutica.

4. Microflora intestinal e diabetes mellitus tipo 2

4.1. Relação microflora-obesidade

A patogenia da diabetes mellitus tipo 2 (DM2) assenta num modelo multifatorial onde se destacam as seguintes características: (133)

- **Insulinorresistência periférica**
(ex: diminuição da captação de glicose no sistema músculo-esquelético)
- **Disfunção de células α pancreáticas**
- **Insuficiência relativa células β pancreáticas**
- **Aumento excessivo da reabsorção renal de glicose**
- **Diminuição da atividade das incretinas**
- **Disfunção do tecido adiposo**
- **Tolerância do sistema nervoso central (SNC) ao estado hiperglicémico**
- **Alteração do metabolismo dos lípidos**
(secundário à dieta alimentar, obesidade, sedentarismo e predisposição genética)

Nos últimos anos, tem surgido um particular interesse em clarificar o papel desempenhado pela microflora intestinal no desenvolvimento da obesidade e DM2. (86) (134) Os estudos publicados sobre esta matéria permitiram a elaboração da *Teoria do Armazenamento* - **Figura 4** – (135) que atribui à microflora intestinal uma ação moduladora do metabolismo lipídico do hospedeiro, baseando-se essencialmente em modelos animais que comparam ratos assépticos com aqueles colonizados por determinadas espécies microbianas. (86) Vários investigadores verificaram que ratos assépticos são resistentes à obesidade secundária a uma dieta hipercalórica e de predomínio lipídico, o que poderá relacionar-se com um aumento da expressão de alguns mediadores, designadamente: (136)

- Proteína cinase ativada via AMP (músculo esquelético e fígado)
- AcetilCoA carboxilase e carnitina palmitoiltransferase
(envolvidas na oxidação de ácidos gordos)
- Fator adipocitário induzido pelo jejum (FIAF) – estimula o co-ativador do receptor promotor da proliferação peroxisomal (Pgc-1 α)

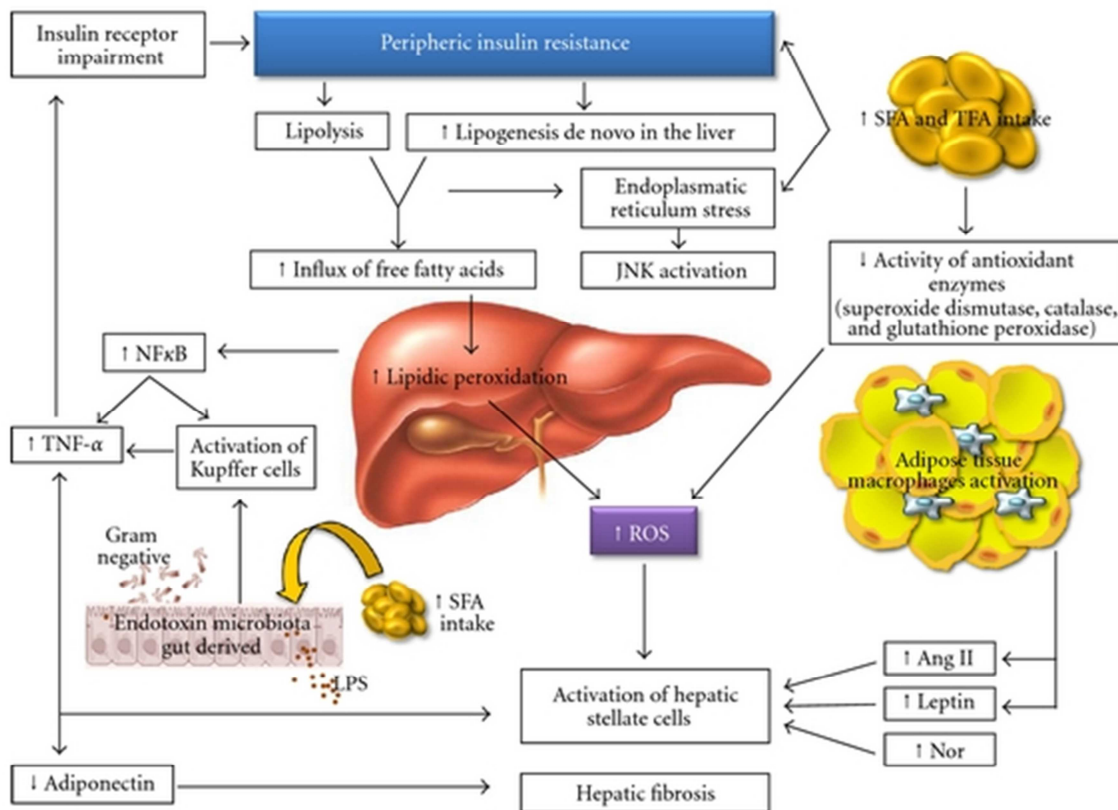


Figura 4. Resumo da Teoria do Armazenamento (Adaptado de Estadella et al. 2013).

NFκB – Fator nuclear kappa B, TNF-α – Fator de necrose tumoral α, LPS – Lipopolissacarídeo, TFA – Ácidos gordos trans, SFA – Ácidos gordos saturados JNK – *Jun N-terminal kinase* ROS – Espécies reativas de oxigénio, AngII – Angiotensina II, Nor – Noradrenalina,

Contudo, a complexidade dos mecanismos envolvidos tem originado alguma controvérsia entre as conclusões dos estudos publicados sobre este tema. (137)

A colonização de ratos assépticos com espécies microbianas promotoras de obesidade pode potenciar um acréscimo de até 40% da massa gorda, comparativamente à colonização dos animais com espécies anti-obesogénicas. (138, 139)

Importa também referir que o papel da microflora no metabolismo lipídico poderá ter repercussões sistémicas, nomeadamente ao nível do olho – ex: diminuição dos níveis de fosfatidilcolina no cristalino e elevação dos níveis de etanolamina na retina – (140) e fígado (esteatose). (141)

Ley e colaboradores verificaram que ratos obesos apresentam uma redução de 50% na população de *Bacteroides* e um aumento na contagem de *Firmicutes*; (142) esta alteração no perfil microbiano ocorre igualmente em ratos que não expressam o receptor TLR2. (143)

A ablação dos receptores de leptina ao nível do sistema nervoso central (ex: hipotálamo) traduziu-se numa população microbiana com proporções inversas à anterior; contudo, ainda não é possível afirmar se a microflora é modulada direta ou indiretamente (via obesidade) pela leptina. (144, 145)

A evidência colectada em estudos com humanos é concordante com aquela obtida em modelos animais, traduzindo-se igualmente num predomínio de *Firmicutes* e redução da diversidade bacteriana intestinal. (141, 146)

A análise do perfil microbiano intestinal de uma amostra populacional de indivíduos com DM2 no Sul da China revelou que os mesmos apresentam uma maior fração populacional de *Lactobacillus* e, em contrapartida, menor quantidade de espécies de *Bifidobacterium*. (147)

Um estudo do perfil microbiano de indivíduos obesos e insulinoresistentes revelou uma redução populacional de *Faecalibacterium prausnitzii*, uma bactéria com potencial anti-inflamatório. (148)

A influência da dieta alimentar na composição microbiana intestinal tem particular importância no desenvolvimento de DM2. De fato, um regime alimentar dito “ocidental” (elevado teor em hidratos de carbono e lípidos) contribui naturalmente para um fenótipo obeso e para um incremento populacional de *Firmicutes*, sendo possível restaurar o microbioma original com a introdução de uma dieta equilibrada. (149) Contudo, ainda não está esclarecido se a obesidade é causa ou consequência das alterações microbianas vigentes.

A administração de dieta alimentar rica em lípidos em ratos que não expressam a molécula RELM- β (*resistin-like molecule β*) – isto é, resistentes à obesidade induzida pela ingestão lipídica - produziu alterações na microflora intestinal semelhantes àsquelas observadas em ratos *wild-type*. (150)

Quando se abordou anteriormente o modelo mutualista flora-hospedeiro destacou-se a importância dos primeiros 2 anos de vida para o desenvolvimento equilibrado das diferentes espécies que compõem a flora intestinal.

Neste sentido, vários estudos publicados concluem que, durante a infância, determinados fatores podem aumentar o risco de colonização intestinal por espécies ditas “obesogênicas” (ex: *Enterobacteriaceae*; *C.difficile*) em detrimento de espécies “anti-obesogênicas” (*Bacteroides*; *Bifidobacteria*):

- **Parto por cesariana** (151)
- **Aleitamento com leite de fórmula** (152)
- **Antibioterapia:** alguns investigadores verificaram que o cumprimento de 5 dias de antibioterapia oral altera a composição da flora intestinal (redução da população de bactérias anti-obesogênicas) demorando, em média, 4 semanas para restaurar a flora original. A recolonização intestinal por *Bacteroides* foi mais lenta do que por *Bifidobacterium*. (153)

Ainda no contexto da obesidade infantil, verificou-se que o sucesso terapêutico dependerá da composição da flora intestinal *a priori* (154); um estudo envolvendo o perfil microbiano intestinal de crianças obesas revelou uma maior percentagem de *S.aureus* no primeiro ano de vida. (155)

O estudo microbiano de amostras fecais recolhidas em irmãos gémeos (monozigóticos e dizigóticos) e nas respectivas mães concluiu que nos gémeos obesos existe uma maior proporção de *Firmicutes* e *Actinobacteria* e uma menor proporção de *Bacteroides* (156)

Apesar dos resultados promissores, existem vários estudos com conclusões heterogêneas, em parte justificadas não só pela diversidade de metodologias usadas como também pela complexidade do estilo de vida humano (presença de variáveis confundidoras como a frequência e composição das refeições). (154, 157-161)

Neste sentido, ainda não foi perfeitamente demonstrada a relação de causalidade entre microflora intestinal e obesidade em humanos.

4.2. A “endotoxemia metabólica”

A patogênese de doenças metabólicas inclui uma resposta inflamatória de baixo grau (fatores desencadeantes ainda pouco conhecidos) modulada pelo sistema imune. (162, 163)

Neste sentido, pensa-se que o fenómeno inflamatório presente na DM2 tenha origem no intestino e seja influenciado pela interação dieta-microflora. Em alguns dos estudos publicados, verificou-se que uma dieta rica em lípidos leva à ativação das células de Kupffer, responsáveis pelo aparecimento de um cenário de insulinoresistência e intolerância à glicose; este cenário é reversível após diminuição da atividade destas células. (164, 165)

Existe evidência científica recente que atribui a certas bactérias intestinais um papel pró-inflamatório em organismos obesos e insulinoresistentes, mediante atividade do LPS, um lipopolissacarídeo constitutivo da membrana externa das bactérias Gram negativas. (166, 167)

Cani e seus colaboradores demonstraram que ratos alimentados durante 4 semanas com dieta de predomínio lipídico exibiam não só um fenótipo obeso como também uma alteração do seu microbioma (aumento da razão bactérias Gram-/Gram + por diminuição da contagem de bactérias Gram +) e um aumento considerável (2-3 vezes) na concentração sérica de LPS; a este último achado deram a designação de “endotoxemia metabólica”. (168)

Os níveis plasmáticos de endotoxinas podem aumentar como consequência do aumento da produção ou absorção intestinais do LPS. Pensa-se que os mecanismos envolvidos na absorção de LPS poderão basear-se numa maior permeabilidade intestinal, em consequência de:

- **Alteração na barreira intestinal**

Exemplos:

- a) Processo inflamatório local (via *glucagon-like peptide 2* - GLP-2) (169)
- b) Diminuição da expressão de zonulina e claudina (169)

- **Alteração do teor lipídico do regime alimentar**

Exemplos:

- a) A formação de *quilomicrons* promove a absorção de LPS. (170)

Vários investigadores verificaram que o processo de absorção lipídica no intestino pode estar relacionado com a endotoxemia metabólica. (171, 172)

Por outro lado, um excesso de frutose também poderá produzir o mesmo efeito. (173)

O aumento do nível sérico pós-prandial de LPS associa-se a um incremento da secreção de citocinas como IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e outros mediadores como TLR4. (174-176)

Estes efeitos não foram observados em dietas ricas em proteínas, hidratos de carbono, fibras ou fruta. (171, 177)

Neste sentido, é fundamental ampliar o conhecimento atual sobre o impacto dos diferentes nutrientes na produção e absorção intestinais de LPS, sobretudo no contexto terapêutico das doenças metabólicas.

4.3. Terapêutica – modulação da microflora

Nos últimos anos, a crescente clarificação sobre a ação de determinadas espécies bacterianas na homeostasia metabólica do hospedeiro e o seu envolvimento na DM2, tem motivado a realização de estudos no sentido de encontrar novas estratégias terapêuticas com potencial curativo.

4.3.1. Prebióticos

Um dos agentes mais estudados têm sido os prebióticos, definidos como qualquer ingrediente alimentar não-digerível, que promovem o crescimento e colonização intestinais de agentes comensais do intestino, sobretudo cólon (ex: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*), com impacto positivo na saúde do hospedeiro. (178)

Curiosamente, estes produtos podem servir de substrato para os probióticos e, desse modo, desenvolver um efeito terapêutico sinérgico. (121)

Os oligossacarídeos não digeríveis são atualmente os prebióticos mais usados, podendo derivar de frutose, manose, xilose, galactose, entre outros. (121)

Estes elementos podem ser encontrados em vários alimentos, sobretudo frutas (ex: banana) e vegetais (ex: cebola, alcachofra, alho). (178)

O seu mecanismo terapêutico ainda não está totalmente esclarecido - **Figura 5** (179) - é usado preferencialmente na forma de fibra solúvel. (166)

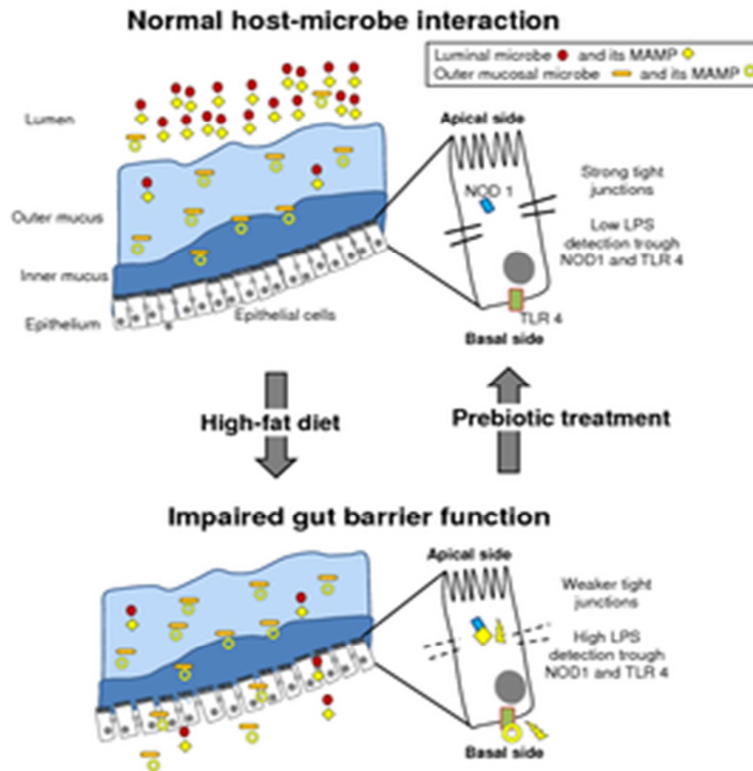


Figura 5. Mecanismo de ação dos prebióticos (Adaptado de Grootaert et al. 2011).

MAMP – Microbial Associated Molecular Pattern, NOD1 – Nucleotide Oligomerization Domain, TLR4 – Toll-like receptor 4

Existem 4 critérios classificativos dos ingredientes prebióticos: (180)

- Não são hidrolisados ou absorvidos no trato gastrointestinal proximal
- Sofrem fermentação por ação de um número limitado de bactérias presentes no cólon
- Alteram de forma benéfica a composição da microflora cólica
- Promovem efeitos benéficos na saúde do hospedeiro.

Pensa-se que a fermentação dos prebióticos pelas bactérias do cólon estimule a secreção de hormonas como GLP-1 (regula a secreção de insulina, a utilização periférica de glicose e fluxo vascular) e GLP-2 (mantém a integridade da barreira intestinal; protege-a contra o LPS) pelas células entero-endócrinas tipo L. (181-183)

No contexto da DM2, destacam-se 2 prebióticos com benefício terapêutico e são também os únicos a respeitar todas as características acima referidas: fructoligosacarídeos (FOS) e galactoligosacarídeos (GOS), sendo o primeiro um importante promotor da secreção de GLP-1. (184)

Cani e colaboradores (2009) avaliaram o potencial terapêutico da oligofructose em ratos obesos e insulinoresistentes, tendo verificado um aumento dos níveis circulantes de GLP-1 e GLP-2, diminuição da endotoxemia, redução dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias e preservação da barreira intestinal. O uso de moduladores da ação de GLP-2 (agonistas e antagonistas) veio influenciar os efeitos anteriormente referidos, tendo corroborado a tese de que esses mecanismos dependem de GLP-2. (184)

Pamell e Reimer (2011) procuraram estudar os efeitos dos prebióticos na homeostasia metabólica de doentes obesos e insulinoresistentes. (185) O tratamento durou 12 semanas, tendo sido verificado um papel modulador de peptídeos como a grelina e o PYY associado a emagrecimento e melhoria da tolerância à glicose.(185)

Lecerf e colaboradores (2012) verificaram que o uso de prebióticos como xilo-oligossacarídeos ou inulina modificam os níveis de AGCCs (no seguimento da fermentação bacteriana) (186) e reduzem os níveis plasmáticos de LPS, traduzindo-se numa menor expressão de citocinas inflamatórias habitualmente presentes na DM2. (187)

Dehghan e colaboradores (2014) administraram oligofructose combinada com inulina durante 8 semanas em mulheres com síndrome metabólico e verificaram uma redução dos níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios (ex: TNF- α , IL-10) e de LPS. (188)

A administração de um prebiótico análogo da inulina em mulheres obesas durante 3 meses resultou num incremento da população de *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium prausnitzii*, habitualmente diminuída em doentes com DM2 e consideradas bactérias benéficas para o hospedeiro, ao correlacionar-se negativamente com a endotoxemia metabólica. (189)

O uso de um esquema combinado de prebiótico associado a *B. longum* (probiótico) provocou uma redução da endotoxemia em doentes com esteatose hepática não alcoólica. (190)

Existem outros componentes alimentares que, por chegarem intactos à porção distal do trato gastrointestinal poderão comportar-se como prebióticos, nomeadamente compostos fenólicos presentes na fruta, vegetais e chocolate. Foram obtidos resultados promissores com o uso de romã em ensaios clínicos com humanos. (191) O uso combinado de vitamina D e prebióticos poderá aumentar a sensibilidade à insulina em doentes pré-diabéticos. (192)

Os dados obtidos nos ensaios em humanos são ainda insuficientes para estabelecer a dosagem necessária para observar o efeito anti-diabetogénico destes produtos.

Contudo, pensa-se que o crescimento populacional de *Bifidobacterium* seja desencadeado por uma dose mínima de 4g/dia. (193)

4.3.2. Probióticos

A viabilidade terapêutica dos probióticos também tem sido estudada em doentes com DM2. Estes agentes têm a capacidade de influenciar não só a adesão de certas bactérias à mucosa intestinal (194), como também na manutenção da permeabilidade intestinal, regulação da atividade do sistema imune via produção de IgA e secreção de IL-10. (195) (196)

A administração destes agentes em ratos diabéticos tratados com gliclazida induziu um aumento da absorção sistêmica deste fármaco. (122)

O uso combinado de um probiótico com *aloe vera* em ratos com síndrome metabólico revelou uma melhoria significativa do perfil lipídico bem como um incremento populacional de *Lactobacillus*. (197)

Em humanos, o consumo de leite contendo *L.gasseri* em indivíduos obesos produziu uma significativa redução da gordura visceral e subcutânea e consequente diminuição do índice de massa corporal. (198)

Existe uma série de estudos envolvendo mulheres grávidas submetidas à utilização de *L.rhamnosus* e *B. lactis*, tendo sido verificado um melhor controlo glicémico (199) e um menor risco de insulinoresistência. (200, 201)

4.3.3. Antibioterapia

Quanto à aplicabilidade da antibioterapia como alternativa terapêutica na DM2, Cani e colaboradores verificaram que a administração de ampicilina e neomicina em ratos obesos produz uma resposta positiva contra a endotoxemia metabólica, ao diminuir os níveis cecais de LPS com consequente redução da inflamação intestinal e diminuição do peso corporal. (202)

Membrez e colaboradores verificaram que após 2 semanas de utilização do esquema de antibioterapia – norfloxacina e ampicilina – em ratos obesos e insulinoresistentes, ocorreu uma melhoria significativa na tolerância à glicose, nos níveis de glicemia em jejum e ainda um aumento dos níveis de adiponectina. (203)

4.3.4. Transplante Fecal

Uma das estratégias terapêuticas inovadoras corresponde ao transplante fecal.

Vrieze e colaboradores (2012) procuraram avaliar o impacto no metabolismo da glicose e na microflora intestinal provocado pelo transplante fecal de dador magro e saudável em indivíduos do sexo masculino com síndrome metabólico; foram selecionados 18 indivíduos, os quais foram submetidos a colheita de amostra fecal, biópsia e lavagem intestinais. Após este procedimento foram criados 2 grupos de 9 elementos: no primeiro realizou-se um transplante alogénico (dador magro com IMC $<23\text{kg/m}^2$) e no segundo (grupo controlo) foi efectuado transplante autólogo. Decorridas 6 semanas após o transplante, assegurou-se o estudo comparativo através de novas colheitas fecais e biópsias intestinais.(204)

Estes investigadores reportaram uma melhoria significativa da insulinosensibilidade periférica e diminuição da gluconeogénese, bem como uma maior diversidade microbiana no grupo do transplante alogénico, marcada por um crescimento populacional de bactérias produtoras de butirato. Não foi reportada qualquer alteração histológica intestinal entre as biópsias pré e pós-transplante.(204)

A viabilidade terapêutica do transplante fecal ainda não é uma realidade; contudo, se se der continuidade a este estudo, este procedimento poderá assumir-se como uma séria alternativa ao tratamento convencional. (205)

5. Conclusão

A influência microbiana intestinal na homeostasia do ser humano tem sido amplamente estudada no século vigente; trata-se de um importante “ator” ambiental que poderá, mediante a sua composição, influenciar positiva ou negativamente o desempenho fisiológico do hospedeiro.

No contexto da DM, apesar dos auspiciosos resultados apresentados nas várias publicações científicas dirigidas ao efeito anti-diabetogénico de certas bactérias da flora intestinal, tem sido difícil validar o seu papel na patogenia da obesidade e da insulinoresistência.

Neste sentido, é imprescindível continuar a investir cientificamente no esclarecimento dos efeitos metabólicos exercidos por estes microrganismos.

A exequibilidade e aplicabilidade da modulação microbiana intestinal no tratamento da DM têm sido corroboradas por vários investigadores, ainda que seja necessário reforçar a evidência científica disponível atualmente.

De fato, tanto os probióticos como os prebióticos revelaram, entre outras funções, um importante papel regulador do metabolismo da glicose e da insulinoresistência, com capacidade para intervir não só a nível preventivo (se DM1) como também a nível curativo (se DM2).

O transplante fecal é a mais inovadora e surpreendente estratégia terapêutica da DM; as potencialidades deste procedimento necessitam ainda de ser exploradas. Existe uma grande expectativa em torno da sua viabilidade, pelo que, uma vez confirmada, poderá revolucionar o programa terapêutico da DM, concretamente a DM2.

Referências Bibliográficas

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030: *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-53.
2. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 6th ed.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.
Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>
3. Egger G, Dixon J. Beyond Obesity and Lifestyle: A Review of 21st Century Chronic Disease Determinants. *Biomed Res Int* 2014, 2014: 731685
4. 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). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.010>
5. Frank, D.N., A.L. St Amand, R.A. Feldman, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2007 104: 13780–13785.
6. Cani PD, Everard A. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2013, 27: 73–83.
7. Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM. A microbial world within us. *Mol Microbiol* 2006; 59:1639–1650
8. Palmer C, Bik EM, Digiulio DB, Relam DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biol* 2007;5:e177
9. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 1996;4: 430-5
10. 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):2574–258

11. 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
12. Arumugam M., J. Raes, E. Pelletier, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473: 174–180.
13. Wong JM. Jenkins DJ. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *J Nutr* 2007; 137(Suppl. 11); S2539S-S46
14. O'Hara AM. Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; 7:668-93
15. Gorbach SL. Lactic acid bacteria and human health. *Ann Med* 1990; 22: 37-41
16. Blumberg R, Powrie F. Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey. *Science Translational Medicine* 2012;4(137):rv7
17. 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
18. Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM, Schmitt Jr MG. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* 1980;78:1500–7
19. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16767–16772
20. 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; 461:1282–6
21. 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

22. 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: 1654–61.
23. Van Immerseel F, Ducatelle R, De Vos M, Boon N, Van De Wiele T, Verbeke K, et al. Butyric acid-producing anaerobic bacteria as a novel probiotic treatment approach for inflammatory bowel disease. *Journal of Medical Microbiology* 2010; 59:141–3.
24. 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: 1519–28.
25. Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance, *Immunology*, 2013, 138, 1–11
26. Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, Takakuwa H, et al. Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Medical Microbiology* 2001; 50: 720–7
27. 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
28. Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van Baarlen P. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(Suppl 1):4607–4614
29. 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
30. Macfarlane S. Macfarlane gt. Bacterial diversity in human gut. *Adv Appl Microbiol* 2004; 54: 261-69
31. Human Microbiome Project Consortium. (2012a). A framework for human microbiome research. *Nature* 486, 215–221

32. Human Microbiome Project Consortium. (2012b). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214
33. Eisenbarth G. Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease? *N Engl J Med* 1986; 314:1360–1368
34. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich HA, Norris JM et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3896–3902
35. Bingley PJ, Mahon JL, Gale EA. Insulin resistance and progression to type 1 diabetes in the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *Diabetes Care* 2008; 31: 146–15
36. Brooks-Worrell B, Palmer JP. Immunology in the Clinic Review Series; focus on metabolic diseases: development of islet autoimmune disease in type 2 diabetes patients: potential sequelae of chronic inflammation. *Clin Exp Immunol* 2012; 167: 40–46
37. Oresic M, Simell S, Sysi-Aho M, Nanto-Salonen K, Seppanen- Laakso T, Parikka V et al. Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med* 2008; 205: 2975–2984
38. Liu LL, Lawrence JM, Davis C, Liese AD, Pettitt DJ, Pihoker C et al. Prevalence of overweight and obesity in youth with diabetes in USA: the SEARCH for Diabetes in Youth study. *Pediatr Diabetes* 2010; 11: 4–11
39. Pflueger M, Seppanen-Laakso T, Suortti T, Hyotylainen T, Achenbach P, Bonifacio E et al. Age- and islet autoimmunity-associated differences in amino acid and lipid metabolites in children at risk for type 1 diabetes. *Diabetes* 2011; 60: 2740– 2747
40. Pang TT, Narendran P. Addressing insulin resistance in Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2008; 25: 1015–1024

41. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G et al. Genetics of Type 1 diabetes: what's next? *Diabetes* 2010; 59: 1561–1571
42. Garg G, Tyler JR, Yang JH, Cutler AJ, Downes K, Pekalski M et al. Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4 + CD25 + regulatory T-cell function. *J Immunol* 2012; 188: 4644–4653
43. Bottini, N., L. Musumeci, A. Alonso, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat. Genet.* 2004; 36: 337–338
44. Ueda,H., J.M.Howson, L. Esposito, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423: 506–511
45. Vehik K, Beam CA, Mahon JL, Schatz DA, Haller MJ, Sosenko JM et al. Development of autoantibodies in the TrialNet Natural History Study. *Diabetes Care* 2011; 34: 1897–1901
46. Derbinski J, Kyewski B. How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 592–60
47. Redondo, M.J., P.R. Fain & G.S. Eisenbarth. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog. Horm. Res.* 2001, 56: 69–89.
48. Thomson, G., W.P. Robinson, M.K. Kuhner, et al. Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulindependent diabetes mellitus. *Am. J. Hum. Genet.*1988; 43: 799–816
49. Bell, G.I., S. Horita & J.H. Karam. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulindependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1984; 33: 176–183
50. Campbell, N., X.Y. Yio, L.P. So, et al. The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunol. Rev.* 1999; 172: 315–324

51. Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004, 118: 229–241
52. Jarry, A., C. Bossard, C. Bou-Hanna, et al. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J. Clin. Invest.* 2008, 118: 1132–1142
53. Macpherson, A.J. & N.L. Harris. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, 4: 478–485
54. Reikvam, D.H., A. Erofeev, A. Sandvik, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One* 2011, 6: 17996–18009
55. Pabst, O., H. Herbrand, M. Friedrichsen, et al. Adaptation of solitary intestinal lymphoid tissue in response to microbiota and chemokine receptor CCR7 signaling. *J. Immunol.* 2006, 177: 6824–6832
56. Meddings, J.B., J. Jarand, S.J. Urbanski, et al. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *Am. J. Physiol.* 1999, 276: G951–G957
57. Watts, T., I. Berti, A. Sapone, et al. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102: 2916–2921
58. Neu, J., Reverte CM, Mackey AD, et al. Changes in intestinal morphology and permeability in the biobreeding rat before the onset of type 1 diabetes. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2005, 40: 589–595
59. Wen L, Ley R, Volchkov P, Stranges P, Avanesyan L, Stonebraker A et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455(7216):1109–1113

60. Carratu, R.,M. Secundulfo, L. de Magistris, et al. Altered intestinal permeability to mannitol in diabetes mellitus type I. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1999; 28: 264–269
61. Kuitunen, M., T. Saukkonen, J. Ilonen, et al. Intestinal permeability to mannitol and lactulose in children with type 1 diabetes with the HLA-DQB1*02 allele. *Autoimmunity* 2001, 35: 365–368
62. Sapone, A, Magistris L, Pietzak M, et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 2006, 55: 1443–1449
63. Bosi, E., L. Molteni, M.G. Radaelli, et al. Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2006; 49: 2824–2827
64. Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, et al. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PLoS One* 2011, 6: 25792–25801
65. Westerholm-Ormio, M., O. Vaarala, P. Pihkala, et al. Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2287– 2295
66. Secundolfo M, de Magistris L, Fiandra R, Caserta L, Bellatta M, Tartaglione MT, Riegler G, Biagi F, Corazza GR, Carratu R. Intestinal permeability in Crohn's disease patients and their first degree relatives. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 680-685
67. Valladares R, Sankar D, Li N, Williams E, Lai KK, Abdelgeliel AS et al. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. *PLoS One* 2010; 5(5): e10507
68. Turley S, Poirot L, Hattori M, et al. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J. Exp.Med.* 2003, 198: 1527–1537

69. Gagnerault MC, Luan J, Lotton C, Lepault F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med* 2002, 196: 369–377
70. Pugliese A. The multiple origins of type 1 diabetes. *Diabet Med* 2013, 30, 135–146
71. Roep BO, Peakman M. Diabetogenic T lymphocytes in human type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 746–753
72. Kriegel MA, Sefik E, Hill JA, Wu HJ, Benoist C, Mathis D. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci* 2011, 108:11548–11553
73. Zaph, C, Du Y, Saenz SA, et al. Commensal dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. *J. Exp. Med.* 2008; 205: 2191–2198
74. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MA (2011) Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* 34:794–806
75. Atkinson M., Chervonsky A. Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animal models of disease. *Diabetologia* 2012 ; 55: 2868-2877
76. Dubois, B, Joubert G, Gomez de Agüero M, et al. Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance. *Gastroenterology* 2009, 137: 1019–1028
77. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3 +regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology* 2011; 11: 119–130
78. Tree T, Roep BO, Peakman M. A mini meta-analysis of studies on CD4+CD25+ T cells in human type 1 diabetes: report of the Immunology of Diabetes Society T Cell Workshop. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006, 1079: 9–18
79. Ostman S, Rask C, Wold A, et al. Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *Eur. J. Immunol.* 2006, 36: 2336–2346

80. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010, 107: 12204–12209
81. Sgouroudis E, Piccirillo CA. Control of type 1 diabetes by CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells: lessons from mouse models and implications for human disease. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2009, 25: 208–218.
82. Mazmanian SK., Round JL., Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008, 453:620–625
83. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009, 139: 485–498.
84. Gravit L. Microbiome: the critters within. *Nature* 2012, 485: S12-S13
85. Lau K, Benitez P, Ardisson A, Wilson TD, Collins EL, Lorca G, Li N, Sankar D, Wasserfall C, Neu J, Atkinson MA, Shatz D, Triplett EW, Larkin J 3rd. Inhibition of type 1 diabetes correlated to a *Lactobacillus johnsonii* N6.2-mediated Th17 bias *J Immunol.* 2011;186 (6):3538-46
86. 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
87. Willcox A., Richardson S, Bone A, et al. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp Immunol* 2009; 155: 173–181
88. Tiittanen, M, Westerholm-Ormio M, Verkasalo M, et al. Infiltration of forkhead box P3-expressing cells in small intestinal mucosa in coeliac disease but not in type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 2008, 152: 498–507
89. Furlanos S, Varney MD, Morahan G et al. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diabetes Care* 2008, 31:1546–1549

90. Murri M, Leivai I, Gomez-Zumaquero JM., Tinahones F, Cardona F, Soriguer F, Queipo-Ortuño M. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study *BMC Medicine* 2013, 11:46
91. Goffau MC, Luopajarvi K, Knip M, Ilonen J, Ruotula T, Härkönen T, Orivuori L, Hakala S, Welling GW, Harmsen HJ, Vaarala O. Fecal microbiota composition differs between children with β -cell autoimmunity and those without. *Diabetes*. Apr 2013;62(4):1238-44
92. Mejía-León ME, Petrosino JF, Ajami NJ, Domínguez-Bello MG, de la Barca AM. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Sci Rep* 2014 Jan 22;4:3814
93. Giongo A, Gano KA, Crabb DB, et al. 2010. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME J*. 5: 82–91
94. TEDDY Study Group. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008, 1150: 1–13
95. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, et al. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* 2008; 51: 726–735
96. Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clin Exp Immunol* 2012; 168: 12–23
97. Jaidane H, Sane F, Hiar R, Goffard A, Gharbi J, Geenen V et al. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: enterovirus, thymus and type 1 diabetes pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 2012, 168: 39–46
98. Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 5115–5120

99. Viskari H, Knip M, Tauriainen S, Huhtala H, Veijola R, Ilonen J et al. Maternal enterovirus infection as a risk factor for type 1 diabetes in the exposed offspring. *Diabetes Care* 2012; 35: 1328–1332
100. Hoorfar, J., K. Buschard & F. Dagnaes-Hansen. Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice. *Br. J. Nutr.* 1993 69: 597–607
101. Boerner B, Starvetnick N. Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2011; 1243 : 103-118
102. Vaarala O, Knip M, Paronen J, et al. Cow milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. *Diabetes* 1999; 48:1389–94.
103. Hansen AK, Ling F, Kaas A, et al. Diabetes preventive gluten-free diet decreases the number of caecal bacteria in non-obese diabetic mice. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2006, 22: 220–225
104. Nip M. Diet, Gut, and Type 1 Diabetes: Role of Wheat-Derived Peptides? *Diabetes*, 2009, 58: 1723-24
105. Maurano F, Mazzarella G, Luongo D, *et al.* Small intestinal enteropathy in non-obese diabetic mice fed a diet containing wheat. *Diabetologia* 2005, 48: 931–937
106. Turley SJ, Lee JW, Dutton-Swain N, et al. Endocrine self and gut non-self-intersect in the pancreatic lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102: 17729– 17733
107. Chakir H, Lefebvre DE, Wang H, et al. Wheat protein-induced pro-inflammatory T helper 1 bias in mesenteric lymph nodes of young diabetes-prone rats. *Diabetologia* 2005; 48: 1576–1584
108. Ejlsing-Duun M, Josephsen J, Aasted B, et al. 2008. Dietary gluten reduces the number of intestinal regulatory T cells in mice. *Scandinavian J. Immunol.* 67: 553–559

109. Auricchio R, Paparo F, Maglio M, et al. 2004. In vitro deranged intestinal immune response to gliadin in type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 1680–1683
110. Cinova J, De Palma G, Stepankova R. Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats. *PLoS One* 2011, 6: 16169–16179
111. Funda DP, Kaas A, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K. Gluten-free but also gluten-enriched (gluten+) diet prevent diabetes in NOD mice; the gluten enigma in type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2008, 24: 59–63
112. Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J. Cell Biochem.* 2010, 109: 801–807
113. Brugman S, Klatter FA, Visser JT, et al. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* 2006; 49: 2105–2108
114. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The ‘hygiene hypothesis’ for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin. Exp. Immunol* 2010, 160: 1–9
115. Vaarala O, Atkinson MA., Neu J. The “perfect storm” for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* 2008; 57:2555–2562
116. Lee AS, Gibson DL, Zhang Y, Sham HP, Vallance BA, Dutz JP. Gut barrier disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice. *Diabetologia* 2010, 53:741–748
117. Chervonsky AV. Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11:28–35

118. Sinkorova Z, Capkova J, Niederlova J, Stepankova R, Sinkora J. Commensal intestinal bacterial strains trigger ankylosing enthesopathy of the ankle in inbred B10.BR (H-2k) male mice. *Hum Immunol* 2008, 69:845–850
119. Reid, G., Jass,J., Sebulsky, M., McCornick, J. Potencial uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev.* Oct 2003; 16(4): 658–672~
120. Sullivan A, Nord C. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine* 2005; 257: 78–92
121. Guarner F, Khan A , Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, Krabshuis J, Lemair T. Probiotics and prebiotics 2011. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Disponível em:
http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/Probiotics_FINAL_20110116.pdf
122. 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: 101-6
123. Kurdi P, Kawanishi K, Mizutani K, Yokota A. Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *J. Bacteriol* 2006, 188: 1979-1986.
124. Hedenborg, G. & Norman, A. (1985) Fasting and postprandial serum bile acid concentration with special reference to variations in the conjugate profile. *Scand J Clin Lab Invest* 1985,45 (2): 151-15
125. Matsuzaki, T., Nagata, Y., Kado, S., Uchida, K., Hashimoto, S. & Yokokura, T. Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on alloxan-induced diabetes in mice. *APMIS* 1997a, 105, 637-642
126. Matsuzaki, T., Y. Nagata, S. Kado, et al. Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus casei*. *APMIS* 1997b, 105: 643–649

127. Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, et al. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 2005; 48: 1565– 1575
128. Chen Q, Kim YC, Laurence A, et al. IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF- β -induced Foxp3⁺ T cells in vivo. *J. Immunol.* 2011; 186: 6329–6337
129. Bejar W, Hamdenb K, Salaha RB, Chouayekh H. *Lactobacillus plantarum* TN627 significantly reduces complications of alloxan-induced diabetes in rats. *Anaerobe* 2013, 24: 4-11
130. Ljungberg M, Korpela R, Ilonen J, Ludvigsson J, Vaarala O. Probiotics for the Prevention of Beta Cell Autoimmunity in Children at Genetic Risk of Type 1 Diabetes—the PRODIA Study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1079: 360–364
131. Neu J, Lorca G, Triplett E, Atkinson M, Schatz D. Novel Probiotic Compositions for Delaying Or Preventing the Onset of Type 1 Diabetes. Office of Technology Licensing. University of Florida. 2013.
Disponível em: <http://apps.research.ufl.edu/otl/viewTechInfo.cfm?case=13091>
132. Daza, G. Los probióticos. Una alternativa en el tratamiento de enfermedades. Argentina, 2004.
Disponível em:
<http://www.monografias.com/trabajos16/probioticos/probioticos.shtml>
133. Lin Y., Sun Z. Current views on type 2 diabetes *Journal of Endocrinology* 2010, 204, 1–11
134. 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
135. Estadella D; Oller do Nascimento CM; Oyama LM; Ribeiro EB; Dâmaso AR; de Piano A. Lipotoxicity: effects of dietary saturated and transfatty acids. *Mediators Inflamm*; 2013, 2013: 1-13

136. 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
137. 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
138. 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
139. 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* 2009a;1:1–10
140. Oresic M, Seppanen-Laakso T, Yetukuri L, Backhed F, Hanninen V. Gut microbiota affects lens and retinal lipid composition. *Exp Eye Res* 2009, 89(5):604–607
141. Spencer M, Hamp T, Reid R, Fischer L, Zeisel S, Fodor A. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology* 2011, 140(3):976–986
142. 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
143. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, Hirabara SM, Castoldi Â, Vieira P, Camara NO, Curi R, Carvalheira JB, Saad MJ. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol.* Dec 2011, 9 (12): e1001212
144. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006, 444(7122):1027–1031

145. Nishizawa Y, Imaizumi T, Tanishita H, Yano I, Kawai Y, Mormii H Relationship of fat deposition and intestinal microflora in VMH rats. *Int J Obes* 1988, 12(2):103–110
146. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006, 444:1022–1023
147. Lê KA, Li Y, Xu X, Yang W, Liu T, Zhao X, Tang YG, Cai D, Go V., Pandol S, Hui H. 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
148. 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;11:63
149. Musso G, Gambino R, Cassader M. The hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care* 2010, 33: 2277-228
150. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill- Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* 2009;137:1716 –1724
151. 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
152. 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
153. 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

154. Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Martí A, Martin-Matillas M, Campoy C, Moreno LA, Veiga O, Redondo-Figuero C, Garagorri JM, Azcona C, Delgado M, García-Fuentes M, Collado MC, Sanz Y; EVASYON Study Group. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:1906–1915
155. Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:534–538
156. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009b; 457: 480–484.
157. 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
158. Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Garagorri M, Moreno LA, Martin-Matillas M, Campoy C, Martí A, Moleres A, Delgado M, Veiga OL, García-Fuentes M, Redondo CG, Sanz Y. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulincoating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes* 2009;33:758–767
159. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 2365–2370
160. Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, Yu P, Zhao C, Li L, Zhou A, Wang J, Moore JE, Millar BC, Xu J. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol* 2010;61:69–78
161. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pederse BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010; 5:e9085
162. Shoelson S, Lee J, Goldfine A. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006, 116:1793–1801

163. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444(7121):860–867
164. Neyrinck AM, Cani PD, Dewulf EM, De Backer F, Bindels LB, Delzenne NM. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385:351–356
165. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, Scott DK, O'Doherty RM. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 2010;59:347–357
166. Serino M, Luche E, Chabo C, Amar J, Burcelin R. Intestinal microflora and metabolic diseases. *Diabetes and Metabolism* 2009;35:262-272
167. 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
168. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761-72
169. 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
170. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res* 2009;50:90–97
171. 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
172. Laugerette F, Vors C, Geloën A, Chauvin MA, Soulage C, Lambert-Porcheron S et al. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *J Nutr Biochem* 2010; 22(1):53–59

173. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2009;50:1094–1104
174. 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
175. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, Tabita-Martinez J, Sellers KF, Rickels MR, Ahima RS, Reilly MP. Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2272–2279
176. Deopurkar R, Ghanim H, Friedman J, Abuaysheh S, Sia CL, Mohanty P, Viswanathan P, Chaudhuri A, Dandona P. 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
177. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, Dandona P. 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
178. Delzenne N, Neyrinck A, Cani P. Gut microbiota and metabolic disorders: how prebiotic can work? *British Journal of Nutrition* 2013; 109: 81–85
179. Grootaert C, Marzorati M, Abbeele P, Wiele T, Possemiers S. Prebiotics to manage the microbial control of energy homeostasis. *Beneficial Microbes* 2011; 2(4): 305-318
180. Gibson GR. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics oligofructose and inulin. *J nutr* 1999; 129 (7): 1438S-41S
181. Holst JJ. The physiology of glucagon-like-peptide 1. *Physiol Rev* 2007; 87:1409-39.

182. 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 peptide1receptor. *Diabetes* 2006;55:1484 –1490
183. Zhou J, Martin RJ, Tulley RT, Raggio AM, McCutcheon KL, Shen L, Danna SC, Tripathy S, Hegsted M, Keenan MJ. Dietaryresistant 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
184. 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; 90:1236-43
185. Parnell JA, Reimer RA: Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroides and Frimicutes in lean and obese JCR: LA-cp rats. *Br J Nutr* 2011, 18:1–13
186. Freeland KR, Wilson C, Wolever TM. Adaptation of colonic fermentation and glucagon-like peptide-1 secretion with increased wheat fibre intake for 1 year in hyperinsulinaemic human subjects. *Br J Nutr* 2010; 103: 82–90
187. 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;108:1847–58
188. Dehghan P, Gargari BP, Jafar-abadi MA. Oligofructose-enriched inulin improves some inflammatory markers and metabolic endotoxemia in women with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial. *Nutrition* 2014; 30: 418-2

189. 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* 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303304>
190. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, Giordano M, Chisari G, Acquaviva R, et al. *Bifidobacterium longum* with Fructooligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2012;57:545–53.
191. Johanningsmeier, S.D. and Harris, G.K., 2011. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science and Technology* 2: 181-201
192. Barengolts, E. Vitamin D and prebiotics may benefit the intestinal microbacteria and improve glucose homeostasis in prediabetes and type 2 diabetes. *Endocr Pract.* 2013; 19(3):497-510
193. Pang G, Xie J, Chen Q, Hu Z. How functional foods play critical roles in human health *Food Science and Human Wellness* 2012; 1(1): 26–60
194. 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
195. McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N et al (2003) Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 52(7):975–980
196. Fukushima Y, Kawata Y, Mizumachi K, Kurisaki J, Mitsuoka T (1999) Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. *Int J Food Microbiol* 46(3):193–197
197. 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 : 574-9

198. 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: 636–43
199. Laitinen K, Poussa T, Isolauri E. Probiotics and dietary counseling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomized controlled trial. *Br J Nutr* 2009; 101: 1679–87
200. Asemi Z, Samimi M, Tabassi Z, Naghibi M, Foroushani A, Khorammian H, Esmailzadeh A. Effect of daily consumption of probiotic yoghurt on insulin resistance in pregnant women: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* (2013) 67, 71–74
201. Luoto R, Laitinen K, Nermes M, Isolauri E. Impact of maternal probiotic supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2010; 103: 1792–9
202. 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: 1470-81
203. 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: 2416-26
204. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, Dallinga-thie G, Ackermans M, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Vlieg JH, Bloks VW, Groen AK, Heilig HG, Zoetendal EG, Stroes ES, De Vos WM Hoekstra JB, Nieuwdorp M. Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology* 2012, 143 (4): 913-916
205. 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 Feb 15. doi: 10.1111/cei.1229