



Universidade de Aveiro  
2021

**ANA CATARINA DOS  
SANTOS COELHO**

**O PAPEL DO MICROBIOMA NAS DOENÇAS  
CARDIOVASCULARES**



Universidade de Aveiro  
2021

**ANA CATARINA DOS  
SANTOS COELHO**

**O PAPEL DO MICROBIOMA NAS DOENÇAS  
CARDIOVASCULARES**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, realizada sob a orientação científica da Doutora Isabel Miranda, Investigadora Auxiliar da Faculdade de Medicina do Porto e da Professora Doutora Maria Adelaide Almeida, Professora catedrática do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

Presidente

**Doutora Isabel Maria Cunha Antunes Lopes**  
Investigadora Principal em Regime Laboral, CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

Arguente

**Doutor António de Sousa Barros**  
Investigador Auxiliar, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

Orientadora

**Doutora Isabel Alexandra Marcos Miranda**  
Investigadora Auxiliar, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

## **agradecimentos**

Quero agradecer, em especial atenção, a importante colaboração da Professora Doutora Isabel Miranda, que aceitou orientar a minha dissertação de mestrado, demonstrando especial carinho e atenção durante todo o processo. As suas sugestões contribuíram para o conhecimento e domínio do microbioma e da microbiota, assim como para a valorização do trabalho desenvolvido.

À Professora Doutora Maria Adelaide Almeida, que aceitou ser minha Coorientadora e que, desde início, demonstrou toda a disponibilidade e colaboração para a realização do tema.

À minha família, por toda a dedicação, apoio e carinho.

A todos os amigos e colegas pela paciência, atenção e força dedicada em momentos menos fáceis.

Quero agradecer também a todos que, direta ou indiretamente, me apoiaram e contribuíram para que esta longa caminhada fosse possível.

**palavras-chave**

microbiota, microbioma, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, dieta, probióticos, prébióticos.

**resumo**

Atualmente, as doenças cardiovasculares (DCV) são a primeira causa de morte a nível mundial e representam um sério problema de saúde pública. A mudança gradual no estilo de vida ocidental caracterizado por uma dieta desequilibrada, sedentarismo, consumo excessivo de álcool e tabagismo, contribuem para o aumento dos fatores de risco das DCV, como sejam a obesidade, a hipertensão e a diabetes. Recentemente, surgiram evidências do papel do microbioma no desenvolvimento das DCV. O avanço da biotecnologia possibilitou o conhecimento de milhões de microrganismos que coabitam no nosso organismo e que fazem parte integrante da nossa microbiota. Associado aos microrganismos estão os metabolitos por eles produzidos, que juntamente com a microbiota constituem o microbioma. São vários os metabolitos microbianos associados às DCV, dos quais se destacam: o N-óxido-trimetilamina (TMAO), indicador de DCV; e os ácidos gordos de cadeia curta, que desempenham funções reguladoras a nível fisiológico.

De modo a aferir se a regulação da microbiota intestinal tem o potencial de se tornar um meio de intervenção no tratamento e na prevenção de DCV, como a diabetes e a obesidade, pretendeu-se realizar uma meta-análise sobre o papel do microbioma nestas doenças. No entanto, por ausência de dados quantitativos, realizou-se uma revisão sistemática. A pesquisa de artigos foi realizada na plataforma PubMed e de acordo com a metodologia PICO. Após a aplicação dos critérios de exclusão e inclusão, obtiveram-se 23 artigos. A mudança de dieta, a prática de exercício físico e as cirurgias bariátricas foram determinantes para a composição da microbiota intestinal e, provocando alterações benéficas e/ou prejudiciais para o controlo da glucose e para a sensibilidade à insulina, consoante o tipo de intervenção. Este estudo salientou ainda, a necessidade de realização de estudos com grupos amostrais maiores, sujeitos a períodos de intervenção e acompanhamento mais extensos.

**keywords**

microbiota, microbiome, cardiovascular diseases, diabetes, obesity, diet, probiotic, prebiotic.

**abstract**

Currently, cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide and represent a serious public health problem. The gradual change in the Western lifestyle led by an unbalanced diet, sedentary lifestyle, excessive alcohol consumption and smoking, contribute to increased risk factors for CVD, such as obesity, hypertension and diabetes. Recently, evidence has emerged of the role of the microbiome in the development of CVD. The advancement of biotechnology has made it possible to know millions of microorganisms that cohabit in our body and that are an integral part of our microbiota. Associated with microorganisms are the metabolites produced by them, which together with the microbiota constitute the microbiome. There are several microbial metabolites associated with CVD, of which: N-oxide-trimethylamine (TMAO), CVD indicator; and short-chain fatty acids, which perform physiological regulatory functions.

In order to assess whether the regulation of the intestinal microbiota has the potential to become a means of intervention in the treatment and in the prevention of CVD, such as diabetes and obesity, it was intended to perform a meta-analysis on the role of the microbiome in these diseases. However, due to the absence of quantitative data, a systematic review was carried out. The research of articles was carried out on the PubMed platform and according to the PICO methodology. After applying the exclusion and inclusion criteria, 23 articles were obtained. Diet change, exercise practice and bariatric surgeries were determinant for the composition of the intestinal microbiota and, causing beneficial and/or harmful changes to glucose control and insulin sensitivity, depending on the type of intervention. This study also highlighted the need to carry out studies with larger sample groups, subject to longer intervention and follow-up periods.

# Índice

Índice de Figuras .....	viii
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas, SIGLAS e Acrónimos.....	x
1. Introdução.....	1
1.1. O Microbioma e a Microbiota .....	1
1.2. A microbiota associada a condições fisiológicas.....	5
1.2.1. A microbiota intestinal diferenciada de acordo com a situação geográfica dos indivíduos.....	8
1.3. A modulação da microbiota pela dieta alimentar.....	9
1.4. Tecnologias que possibilitam o estudo do microbioma.....	11
1.5. O microbioma e as doenças cardiovasculares .....	13
1.5.1. Ácidos gordos de cadeia curta - AGCC .....	14
1.5.2. N-óxido-trimetilamina - TMAO.....	15
1.5.3. Ácidos biliares.....	17
1.6. O microbioma associado à diabetes e à obesidade .....	17
2. Objetivos .....	19
3. Metodologia .....	19
3.1. Critérios de Inclusão para pacientes com diabetes .....	21
3.2. Critérios de Exclusão para pacientes com diabetes.....	21
3.3. Critérios de Inclusão para pacientes com obesidade.....	22
3.4. Critérios de Exclusão para pacientes com obesidade .....	22
4. Resultados.....	23
4.1. Plano para análise de indivíduos com obesidade .....	26
4.2. Plano para análise de indivíduos com diabetes .....	27
4.3. Indivíduos com obesidade.....	30
4.4. Indivíduos com Diabetes .....	34
5. Discussão.....	40
6. Análise Crítica.....	43
7. Conclusão .....	44
8. Referências bibliográficas .....	45

## Índice de Figuras

<b>FIGURA 1</b> – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA EVOLUÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA HUMANA AO LONGO DA VIDA (NAGPAL ET AL., 2018). .....	3
<b>FIGURA 2</b> – DESCRIÇÃO DOS GÊNEROS DE BACTÉRIAS PREVALENTES NA MICROBIOTA AO LONGO DO TRATO GASTROINTESTINAL DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (RUAN ET AL., 2020). .....	5
<b>FIGURA 3</b> - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ABUNDÂNCIAS RELATIVAS (%) DOS GÊNEROS MICROBIANOS QUE COMPÕEM A MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS DE VÁRIOS PAÍSES (GUPTA ET AL., 2017). .....	9
<b>FIGURA 4</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O ESTUDO DO MICROBIOMA HUMANO (AL KHODOR ET AL., 2017). .....	12
<b>FIGURA 5</b> - DIAGRAMA SIMPLIFICADO DA FORMAÇÃO DE TMAO NO FÍGADO E A SUA LIBERTAÇÃO NA CORRENTE SANGUÍNEA (ALMEIDA, 2018; TANG ET AL., 2019). <b>TMAO</b> – N-ÓXIDO-TRIMETILAMINA; <b>TMA</b> - TRIMETILAMINA; <b>FMO3</b> – FLAVINA MONOOXIGENÁSE. ....	16
<b>FIGURA 6</b> - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS PARÂMETROS ANALISADOS PARA CADA AMOSTRA RECOLHIDA, EM JEJUM, DE INDIVÍDUOS COM OBESIDADE OU EXCESSO DE PESO. <b>AGCC</b> – ÁCIDOS GORDOS DE CADEIA CURTA; <b>LBP</b> – PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A LIPOPOLISSACARÍDEOS; <b>AGL</b> – ÁCIDOS GORDOS LIVRES. ....	27
<b>FIGURA 7</b> - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS PARÂMETROS ANALISADOS PARA CADA AMOSTRA RECOLHIDA, EM JEJUM, DE INDIVÍDUOS COM DIABETES TIPO 2. <b>AGCC</b> – ÁCIDOS GORDOS DE CADEIA CURTA; <b>LBP</b> – PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A LIPOPOLISSACARÍDEOS; <b>AGL</b> – ÁCIDOS GORDOS LIVRES; <b>HOMA-IR</b> – AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE – RESISTÊNCIA À INSULINA; <b>AST</b> – ASPARTATO AMINOTRANSFERASE; <b>ALT</b> – ALANINA AMINOTRANSFERASE. ....	28
<b>FIGURA 8</b> - FLUXOGRAMA PRISMA QUE REPRESENTA O PROCESSO REALIZADO PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS ESTUDOS ELEGÍVEIS. ....	29



## Índice de Tabelas

<b>TABELA 1</b> - IMPLICAÇÕES DA DISBIOSE INTESTINAL NA SAÚDE HUMANA (GOMAA, 2020; LARSEN, 2017; SINGH ET AL., 2017). OS DADOS FORAM OBTIDOS A PARTIR DE VÁRIOS ESTUDOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE INDIVÍDUOS (N=3 A N=344). <b>DII</b> – DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL; <b>LPS</b> – LIPOPOLISSACARÍDEOS; <b>FG</b> – GANGRENA DE FOURNIER; <b>HS</b> – HIDRADENITE SUPERATIVA; <b>ITU</b> – INFEÇÕES DO TRATO URINÁRIO; <b>RTL</b> – RECETOR TOLL-LIKE; <b>MALT</b> – TECIDO LINFOIDE ASSOCIADO À MUCOSA; <b>AGCC</b> – ÁCIDOS GORDOS DE CADEIA CURTA; <b>TH</b> – LINFÓCITO T AUXILIAR; <b>CD4</b> – GLICOPROTEÍNAS; <b>SPP</b> – ESPÉCIES. ....	6
<b>TABELA 2</b> - ENUMERAÇÃO E DESCRIÇÃO PRÉVIA DOS ARTIGOS SELECIONADOS PARA ESTA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	24
<b>TABELA 3</b> - RESUMO DOS ARTIGOS SELECIONADOS PARA A ANÁLISE SISTEMÁTICA EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE E/OU EXCESSO DE PESO E OS SEUS RESPECTIVOS OBJETIVOS E RESULTADOS. ....	33
<b>TABELA 4</b> - RESUMO DOS ARTIGOS SELECIONADOS PARA A ANÁLISE SISTEMÁTICA EM INDIVÍDUOS COM DIABETES TIPO 2 E OS SEUS RESPECTIVOS OBJETIVOS E RESULTADOS.....	38

## Lista de Abreviaturas, SIGLAS e Acrónimos

**AB** – Ácidos biliares

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**AGCC** – Ácidos gordos de cadeia curta

**AGCR** – Ácidos gordos de cadeia ramificada

**AGL** – Ácidos gordos livres

**ALT** – Alanina aminotransferase

**AOS** – Arabinooligosacarídeos

**ARN** – Ácido ribonucleico

**AST** – Aspartato aminotransferase

**BBR** – Beberina

**BGA** – Cirurgia de banda gástrica ajustável

**BGRY** – Cirurgia de bypass gástrico Roux-en-Y

**BSH** – Hidrólise de sais biliares

**Ca<sup>2+</sup>** - iões de cálcio

**CCR** – Cancro colo-rectal

**CD4** – linfócitos auxiliares

**DCA** – Ácido desoxicólico

**DCV** – Doença cardiovascular

**DII** – Doença inflamatória intestinal

**DRC** – Doença renal crónica

**FG** – Gangrena de Fournier

**FMO3** – flavina monooxigenase hepática

**FOS** – Frutooligosacarídeos

**FXR** – recetor Farnesoid X

**GABA** – Ácido Gama-aminobutírico

**GLP-1** – Peptídeo semelhante a glucagon 1

**GLP-2** – Peptídeo semelhante a glucagon 2

**GOS** - Galactooligosacarídeos

**HbA<sub>1c</sub>** – Hemoglobina A<sub>1c</sub>

**HDL** – Lipoproteína de alta densidade

**HOMA-IR** – Avaliação do modelo homeostático para resistência à insulina

**HS** – Hidradenite superativa

**IgA** – Imunoglobina A

**IL-10** – Interleucina 10 b

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-8** – Interleucina 8

**IMC** – índice de Massa Corporal

**IRS** – Substrato do recetor de insulina

**ITU** – Infecções do trato urinário

**ITS** – Inter transcribed spacer

**LBP** – Proteínas de ligação

**LCA** – Ácido litocólico

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade

**LFHCC** – Dieta com baixo teor de gordura e alto teor de carboidratos

**LPS** – Lipopolissacarídeos

**LXR** – Recetor do fígado X

**MALT** – Tecido linfoide associado à mucosa

**mARN** – Acido ribonucleico mensageiro

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PCR** - Proteína C-reativa

**PCR-as** – Proteína C-reativa de alta sensibilidade

**PGH** – Projeto do Genoma Humano

**PMH** - Projeto de Microbioma Humano

**PPM** – Perda de peso médica

**rARN** – Ácido ribonucleico ribossómico

**RTL** - Receptor toll-like

**SII** – Síndrome do Intestino irritável

**TC** – Colesterol total

**TG** – Triglicéridos

**TGRS** – Recetor de ácidos biliares acoplados à proteína G

**Th** – Linfócito T auxiliar

**TMA** - Trimetilamina

**TMAO** – N-óxido-trimetilamina

**TNF-  $\alpha$**  – Fatores de necrose tumoral alfa

**UM-A** - grupo de indivíduos com metabólitos A

**UM-B** – grupo de indivíduos com metabólitos B

**URO-A** – Urolithin A

**UTO** – Unidades taxonómicas operacionais

**XOS** - xylooligosacarídeos

**$\beta$ -GOS** - beta- galactooligossacarídeos

## 1. Introdução

O conhecimento sobre a diversidade de microrganismos que habitam o corpo humano e o seu comensalismo/patogenicidade têm sido alvo de estudo, no entanto o recente desenvolvimento tecnológico das metodologias e plataformas de sequenciação de ácidos nucleicos que tem permitido a sequenciação de genomas e transcriptomas de forma rápida e a baixo custo, origina um grande volume de dados relativamente ao microbioma humano, à composição da microbiota, assim como, ao seu metabolismo. (Davenport et al., 2017; Gomaa, 2020).

O tema despertou especial interesse na última década, uma vez que grande parte do conhecimento sobre o papel do microbioma intestinal nas doenças era de natureza associativa e não baseado em conhecimentos empíricos (Kitai & Tang, 2017). O Projeto do Genoma Humano (PGH) iniciado em 1990 e destinado a mapear o genoma humano, permitiu infundir uma compreensão genómica às doenças humanas (Bray et al., 2016; Gibbs, 2020; Schloss et al., 2020). Usando a mesma abordagem, foi criado em 2007 o Projeto do Microbioma Humano (PMH), financiado pela *National Institute of Health* e teve como objetivo a caracterização do microbioma com o intuito de perceber o seu papel na saúde e no desenvolvimento e progressão de doença (Berg et al., 2020; Davenport et al., 2017).

O conhecimento gerado por estas novas tecnologias designadas de ómicas proporcionam um conhecimento abrangente das possíveis, interações entre o hospedeiro e os microrganismos que nele habitam. Deste modo e por estudos comparativos ficou evidente que uma alteração ou desequilíbrio na composição microbiana, designada de disbiose, está associada ao surgimento de certas doenças, como o cancro do estômago e a doença de Crohn (Gomaa, 2020; Sharpton, 2014).

De facto, a microbiota humana compreende triliões de microrganismos associados a 500-1000 espécies diferentes, que representam 1-3% da massa corporal do hospedeiro. A microbiota alberga mais de 45 milhões de genes, constituindo um segundo genoma, que funciona como um órgão endócrino e individualizado, e que condiciona a fisiologia humana.

### 1.1. O Microbioma e a Microbiota

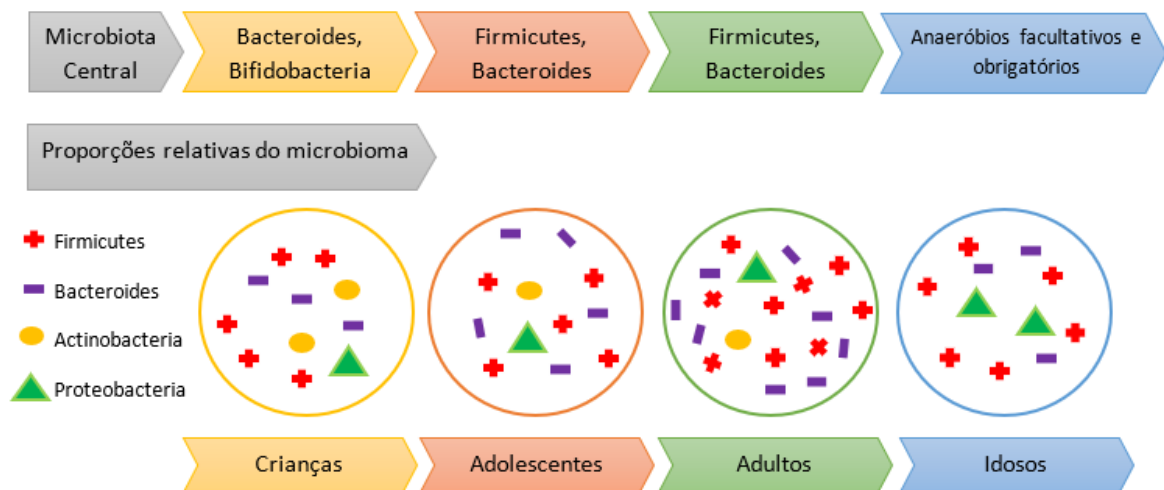
A microbiota representa uma comunidade complexa de microrganismos (bactérias, fungos, protozoários e vírus) num habitat corporal ou ambiental limitado (Barko et al., 2018; Mohajeri et al., 2018; Salazar et al., 2020). A microbiota humana está exposta a diversos fatores biológicos e/ou

ecológicos, sendo estes fatores condicionantes da sua composição (Dominguez-Bello et al., 2019; Ferrer et al., 2017).

O microbioma é caracterizado como um ecossistema formado pela microbiota, o genoma dos microrganismos presentes nesse habitat e os compostos metabólicos resultantes do metabolismo microbiano, nomeadamente as toxinas, as proteínas, os lípidos, os polissacarídeos, as moléculas (in)orgânicas e as moléculas de sinalização (Barko et al., 2018; Berg et al., 2020; Mohajeri et al., 2018; Salazar et al., 2020). Um microbioma é considerado saudável quando demonstra resiliência, ou seja, capacidade de retomar o estado de equilíbrio e de resistência a perturbações (Ruan et al., 2020). Tendo em conta que os organismos presentes variam muito consoante o indivíduo e o meio envolvente (Dominguez-Bello et al., 2019; Ferrer et al., 2017; Ruan et al., 2020), um microbioma saudável pode também ser comprovado a partir das suas funções metabólicas (Ruan et al., 2020).

No corpo humano podemos encontrar diferentes comunidades microbianas que se caracterizam como microbiomas distintos dependendo da sua localização: oral, intestinal, respiratório, cutâneo e vaginal (Ferrer et al., 2017).

Atualmente, o microbioma intestinal, onde se encontra a maior quantidade de microrganismos presentes no corpo, é dos mais estudados em virtude da disbiose deste microbioma estar associada a várias patologias como por exemplo: doenças cardiovasculares, cancro colo-rectal (CCR), a doença inflamatória intestinal (DII) e a síndrome do intestino irritável (SII) (Gomaa, 2020). O microbioma intestinal não se encontra totalmente estabilizado após o nascimento, sofrendo modificações na sua composição consoante a nutrição e os fatores genéticos e ambientais (Gomaa, 2020). Com o aumento da idade, o microbioma torna-se mais estável ficando, no entanto, condicionado pelo ambiente envolvente. A diversidade microbiana é uma característica constante para indivíduos adultos saudáveis. A diminuição da diversidade microbiana da microbiota intestinal está associada ao surgimento e progressão de determinadas doenças (Ruan et al., 2020). Nos idosos, a microbiota apresenta um declínio na diversidade e torna-se novamente instável (figura 1) (Claesson et al., 2012; Salazar et al., 2020).



**Figura 1** – Esquema representativo da evolução da composição da microbiota humana ao longo da vida (Nagpal et al., 2018).

A microbiota intestinal vive e multiplica-se nas superfícies intestinais e possui uma composição variada ao longo do sistema digestivo (Berg et al., 2020; Fitzgibbon & Mills, 2020), sabendo-se até ao momento que está envolvida nas seguintes funções:

- Proteção contra agentes patogénicos, através da estimulação do sistema imunitário e do controlo da proliferação dos microrganismos patogénicos pela restante comunidade microbiana através da secreção de substâncias antimicrobianas;
- Metabolização dos carboidratos não-digeríveis (celulose, hemicelulose, amido resistente, pectina e oligossacarídeos) que através da fermentação anaeróbica proporcionam novas fontes de energia;
- Suporte na digestão e no metabolismo - mediante o controlo da proliferação de células epiteliais que afetam a secreção e a resistência à insulina;
- Síntese de vitaminas (vitamina B, vitamina K, biotina, tiamina e nicotina);
- Biossíntese de colesterol, ácidos biliares e do ácido gama-aminobutírico (GABA) – composto que afeta o sistema nervoso central e periférico (Almeida, 2018; Berg et al., 2020).

Estas características têm influência no sistema de comunicação cérebro-intestino, uma importante ligação que permite ao organismo coordenar as funções intestinais, como os

mecanismos intestinais periféricos – reflexo entérico, permeabilidade intestinal, ativação imunológica e sinalização endócrina (Berg et al., 2020).

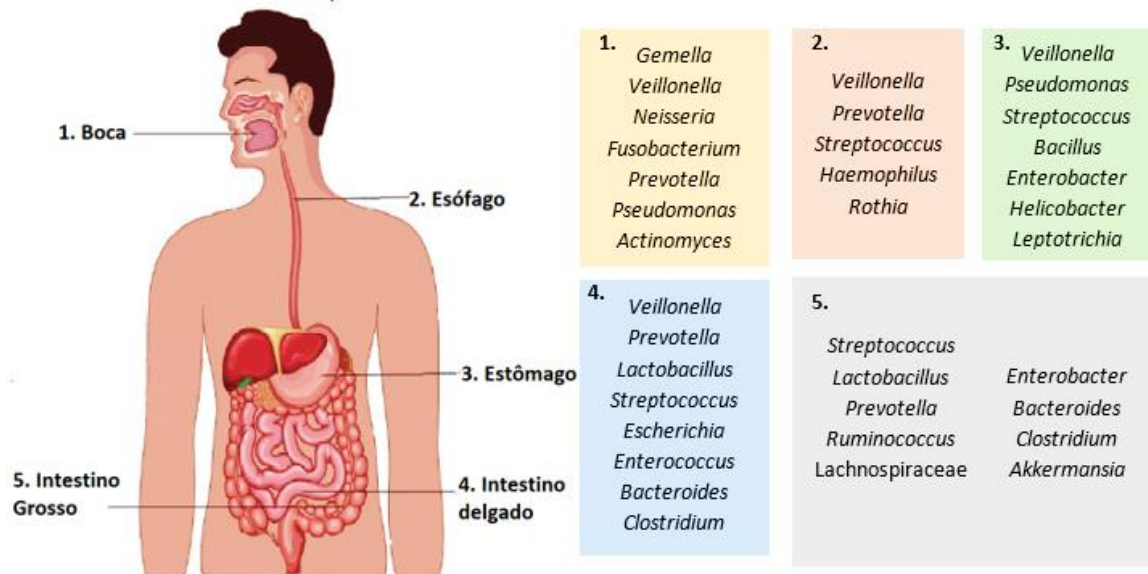
Fatores genéticos do hospedeiro ou fatores externos condicionam alterações da composição relativa da microbiota que pode conduzir o indivíduo a um estado “pró-inflamatório”, onde algumas das funções acima descritas podem ficar diminuídas e, deste modo, afetar a fisiologia intestinal (Annalisa et al., 2014; Barko et al., 2018; Cuervo et al., 2014).

No intestino delgado os microrganismos presentes são anaeróbios facultativos ou obrigatórios (Annalisa et al., 2014), divididos em dois grupos: as Proteobactéria e os Lactobacillales. Destes, os géneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Citrobacter* são mais abundantes (Ruan et al., 2020).

No intestino grosso (mais concretamente na zona do colo retal) as bactérias predominantes são as Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Proteobacteria e Actinobacteria. Esta caracterização da microbiota está esquematizada na Figura 2 e foi realizada em amostras de intestino recolhidas durante uma endoscopia de indivíduos em jejum (Annalisa et al., 2014; Ruan et al., 2020).

Na cavidade oral, nomeadamente na saliva de pacientes saudáveis, os principais géneros encontrados são *Gemella*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Pseudomonas* e *Actinomyces*. Quando passamos para o esófago, o filo predominante é o Firmicutes e o género os *Streptococcus*. Nesta cavidade foi possível verificar três comunidades dominantes, nomeadamente: (i) dominância de *Streptococcus* (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus pneumoniae*); (ii) *Veillonella* e *Prevotella* (*Prevotella melaninogenica* e *Prevotella pallens*) ou (iii) *Haemophilus* (*Haemophilus parainfluenzae*) e *Rothia* (*Rothia mucilaginosa*) (Ruan et al., 2020).





**Figura 2** – Descrição dos gêneros de bactérias prevalentes na microbiota ao longo do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis (Ruan et al., 2020).

## 1.2. A microbiota associada a condições fisiológicas

Tem sido descrita uma correlação entre a composição da microbiota e as condições fisiológicas do indivíduo. A composição da microbiota é constantemente influenciada por inúmeras variáveis, nomeadamente o estilo de vida, a idade, a genética e a saúde do indivíduo.

A disbiose corresponde a um desequilíbrio da microbiota, ou seja, quando a abundância e a distribuição das bactérias é alterada (Houghton et al., 2018). Um indivíduo com disbiose intestinal encontra-se em condições de saúde mais vulneráveis, proporcionados pelo aumento da permeabilidade intestinal, da produção de aminoácidos de cadeia ramificada, de perturbações no metabolismo de ácidos biliares, na diminuição da capacidade de absorção de nutrientes e no aumento da inflamação sistêmica, a partir do aumento de lipopolissacarídeos (LPS) (Gonai et al., 2017; Liu et al., 2020). Na Tabela 1, encontram-se sistematizadas as alterações fisiológicas causadas pela disbiose da microbiota intestinal associadas predominantemente a vários tipos de bactérias, assim como as doenças putativamente resultantes.

**Tabela 1** - Implicações da disbiose intestinal na saúde humana (Gomaa, 2020; Larsen, 2017; Singh et al., 2017). Os dados foram obtidos a partir de vários estudos com diferentes números de indivíduos (n=3 a n=344). **DII** – doença inflamatória intestinal; **LPS** – lipopolissacarídeos; **FG** – gangrena de Fournier; **HS** – hidradenite superativa; **ITU** – Infecções do trato urinário; **RTL** – recetor toll-like; **MALT** – tecido linfoide associado à mucosa; **AGCC** – ácidos gordos de cadeia curta; **TH** – linfócito T auxiliar; **CD4** – glicoproteínas; **spp.** – espécies.

Microrganismo (bactéria)	Características básicas	Alterações fisiológicas associadas	Condições associadas a doenças
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Bactéria de gram-positiva, anaeróbia obrigatória	Produção de AGCC; Barreira mucosa intestinal melhorada; Diminuição dos níveis de LPS intestinais	Abundância reduzida na obesidade
<i>Lactobacillus spp.</i>	Bactéria de gram-positiva; anaeróbia facultativa	Produção de AGCC; atividades anti-inflamatórias; prevenção de cancro	Capacidade de atenuar DII, <i>Lactobacillus lantorum</i> diminui a obesidade; <i>Lactobacillus reuteri</i> aumenta a obesidade; <i>Lactobacillus casei</i> fortalece o sistema imunológico
<i>Bacteroides spp.</i>	Bactéria de gram-negativa; anaeróbia; capacidade de movimento variável	Ativar células CD4 + T	Aumento da abundância no DII; Aumenta em indivíduos com obesidade
<i>Alistipes spp.</i>	Bactéria de gram-negativa, em forma de haste; anaeróbia obrigatória; resistente à biliar e responsável pela produção de pigmentos		Incluído em tecido de apendicite aguda e abscessos perirretais e cerebrais
<i>Bilophila spp.</i>	Bactérias de gram-negativa; anaeróbia obrigatória; resistente à biliar; catalase-positivo	Promove a imunidade pró-inflamatória	Algumas espécies foram observadas em apendicite perfurada e gangrena; abscessos hepáticos e de tecido mole; osteomielite e HS
<i>Clostridium spp.</i>	Bactéria de gram-positiva; anaeróbia obrigatória; formação de esporos	Promove a produção de células TH17	Tétano; botulismo; gangrena;
<i>Roseburia spp.</i>	Bactéria de gram positiva e negativa; anaeróbia obrigatória	Produção de AGCC	Abundância reduzida na DII; Abundância reduzida da <i>Roseburia intestinalis</i> em indivíduos com obesidade ou com diabetes tipo 2

<i>Eubacterium spp.</i>	Bactéria de gram-positiva; anaeróbia obrigatória	Produção de AGCC; formação de ácidos fenólicos benéficos	Abundância reduzida na DII, aterosclerose e em indivíduos com diabetes tipo 2
<i>Enterococcus spp.</i>	Bactéria de gram-positiva; anaeróbia facultativa		Várias spp. são patogênicas para o organismo, podendo causar ITU, endocardite ou bacteremia
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Bactéria de gram-positiva; anaeróbia obrigatória	Produção de AGCC; atividade anti-inflamatória	Abundância reduzida em situações de DII, em indivíduos com obesidade, excesso de peso ou diabetes tipo 2
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Bactéria de gram-negativa; anaeróbia obrigatória; sem capacidade de locomoção	Atividade anti-inflamatória	Abundância reduzida em situações de DII, ITU e meningite
<i>Escherichia coli</i>	Bactéria de gram-negativa; anaeróbia facultativa	Ativação de RTL	Abundância elevada em situações de gastroenterite do DII, ITU, meningite e em indivíduos com diabetes tipo 2
<i>Helicobacter pylori</i>	Bactéria de gram-negativa; microaerófila; móvel		Presente em úlceras, gastrites e cânceros de MALT
<i>Streptococcus spp.</i>	Bactéria de gram-positiva; anaeróbia facultativa		Algumas das spp. são patogênicas para o organismo, podendo causar meningite, pneumonia e endocardite
<i>Neisseria spp.</i>	Bactéria de gram-negativa; anaeróbia facultativa	Fermentação do açúcar	Duas espécies patogênicas: <i>Neisseria meningitidis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ; Reduzida na cavidade oral em fumadores
<i>Prevotella spp.</i>	Bactéria de gram-negativa, anaeróbia	Promove a produção de citocinas; IL-6; IL-8; TNF- $\alpha$	Associada a distúrbios metabólicos e têm grande abundância em indivíduos com inflamação sistêmica de baixo grau

A microbiota tem a capacidade de afetar o metabolismo lipídico, os níveis de glicemia do hospedeiro, a saciedade e a inflamação crônica de baixo grau, fatores que podem contribuir para a obesidade (Canfora et al., 2017). Desta forma, a microbiota intestinal pode ser modulada através de intervenções alimentares e cirurgias tipo bypass (Haro et al., 2016; Lee et al., 2019; Palleja et al., 2016).

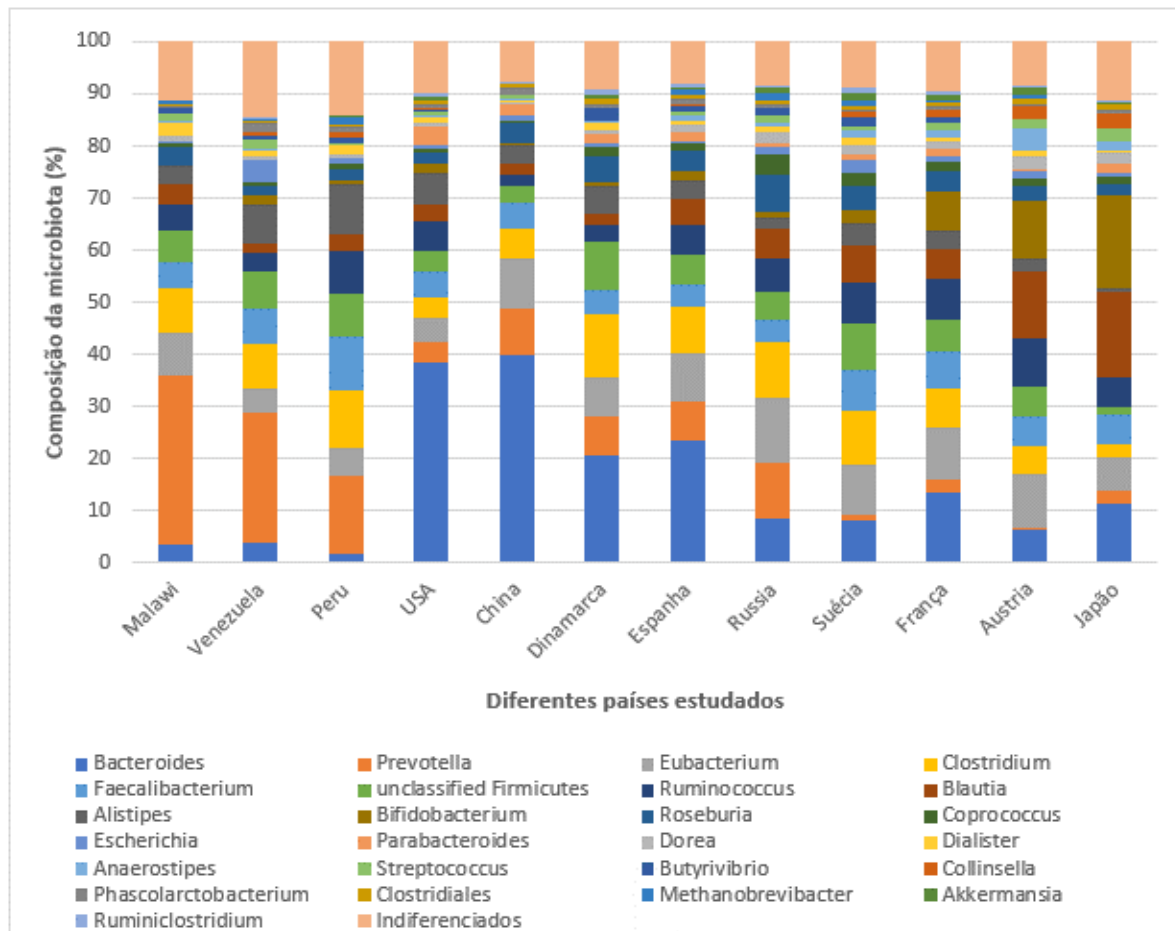
A cirurgia tipo bypass aumenta as bactérias intestinais benéficas, como a *Faecalibacterium prausnitzii* e *Akkermansia muciniphila*. Este resultado é especialmente favorável para indivíduos com diabetes e obesidade em consequência da diminuição da sua diversidade microbiana (Lee et al., 2019). A presença de *Akkermansia muciniphila* proporciona uma diminuição da resistência à insulina e ajuda a diminuir os valores de obesidade através da sua atividade anti-inflamatória (Parolini, 2019). Assim como a *Akkermansia muciniphila* as *Faecalibacterium spp.* apresentam atividade anti-inflamatória e são ainda produtoras de ácidos gordos de cadeia curta (Singh et al., 2017).

### 1.2.1. A microbiota intestinal diferenciada de acordo com a situação geográfica dos indivíduos

Para cada indivíduo, é estimado a presença de 150 a 400 espécies de microrganismos no intestino. Maioritariamente, estas espécies pertencem aos filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria. A microbiota intestinal varia de indivíduo para indivíduo sendo condicionada também pela situação geográfica (Barko et al., 2018; Davenport et al., 2017).

Geralmente, a microbiota dos indivíduos que vivem em países ocidentais é composta por uma maior abundância de *Bacteroides* enquanto que a microbiota dos indivíduos de países menos desenvolvidos é mais abundante em Firmicutes e Proteobacteria (Davenport et al., 2017). Na base destas diferenças microbianas está a alimentação (o acesso a refeições pré-preparadas, o método de confeção dos alimentos e o tipo de dieta predominante), o acesso a cuidados médicos e as condições de higiene (como o saneamento) das populações (Gupta et al., 2017; Lozupone et al., 2012; Shanahan et al., 2017).

Desta forma, os hábitos de vida nos países ocidentais proporcionam uma diminuição de bactérias benéficas na microbiota intestinal (*Bifidobacterium* e *Eubacterium*) (Singh et al., 2017), enquanto que nos países Africanos observa-se o aumento de *Prevotella* e nos países orientais os filos presentes em maior abundância relativa são os Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes (Figura 3) (Gupta et al., 2017). Estas observações demonstraram que, mesmo com a presença de uma microbiota central para cada nicho corporal os géneros bacterianos dominantes variam nos indivíduos saudáveis consoante a sua posição geográfica e/ou a sua etnia (Gupta et al., 2017; Ruan et al., 2020).



**Figura 3** - Representação gráfica das abundâncias relativas (%) dos gêneros microbianos que compõem a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis de vários países (Gupta et al., 2017).

### 1.3. A modulação da microbiota pela dieta alimentar

A modulação da microbiota por intervenções alimentares é um processo muito mais diverso do que acontece nas cirurgias tipo bypass. A modulação é regularmente condicionada pela administração de prebióticos, probióticos, antibióticos (Annalisa et al., 2014; Barko et al., 2018) e ainda de proteínas, gorduras e carboidratos (Salazar et al., 2020; Singh et al., 2017). Cada alimento proporciona uma resposta diferente na microbiota intestinal, mesmo que pertencentes ao mesmo grupo de alimentos (Cuervo et al., 2014).

Os prebióticos são componentes dietéticos não digeríveis que têm a capacidade de beneficiar a saúde do hospedeiro através (i) da redução de marcadores metabólicos, como a IL-6 (citocina pró-inflamatória), colesterol total, colesterol LDL, triglicerídeos e HbA<sub>1c</sub> (Singh et al., 2017) e (ii) da estimulação seletiva para o crescimento e a atividade metabólica de alguns

microrganismos. Alguns exemplos de prebióticos são os oligossacarídeos [frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), arabinooligossacarídeos (AOS) e xylooligossacarídeos (XOS)] (Barko et al., 2018; Singh et al., 2017), cuja ingestão promove o aumento de *Bifidobacterium spp.*, bactérias benéficas no controlo da barreira mucosa intestinal, produtoras de AGCC e capazes de diminuir os níveis de LPS e melhorar a tolerância do hospedeiro à glucose (Cuervo et al., 2014; Gonai et al., 2017; Salazar et al., 2020; Singh et al., 2017).

Os probióticos são bactérias benéficas para a saúde humana, quando administrados em quantidades adequadas (Andreasen et al., 2010; Firouzi et al., 2017). Os probióticos ajudam a prevenir a colonização de microrganismos patogénicos e promovem a produção de AGCC, de IgA (imunoglobina A – um agente ativo na defesa do organismo) e de citocinas anti-inflamatórias (como é o caso da IL-10) (Barko et al., 2018). As *Lactobacillus* são um exemplo de bactérias probióticas que ao serem regularmente utilizadas têm a capacidade de melhorar a homeostase da glucose (Gomaa, 2020) e inibir a libertação de citocinas pró-inflamatórias, um fator importante no desenvolvimento da resistência à insulina em indivíduos com diabetes tipo 2 (Sato et al., 2017).

Os carboidratos digeríveis podem aumentar a abundância relativa de *Bifidobacteria* à medida que os *Bacteroides* diminuem e, desta forma, estimular a produção de insulina através da libertação de glucose na corrente sanguínea. No entanto, a administração excessiva destes carboidratos pode induzir a intolerância à glucose por parte do hospedeiro (Shanahan et al., 2017; Singh et al., 2017). Por outro lado, os carboidratos não digeríveis (fibras) são fermentados por microrganismos presentes no intestino grosso (Salazar et al., 2020; Singh et al., 2017) que produzem butirato como produto resultante da sua fermentação (Annalisa et al., 2014). Estes alimentos têm sido associados ao aumento da abundância de *Prevotella* no intestino (Lozupone et al., 2012) e podem ser utilizados como fonte de energia e de carbono para o hospedeiro (Salazar et al., 2020).

As gorduras saturadas têm sido consideradas responsáveis pelo aumento do risco de doenças cardiovasculares e, as gorduras insaturadas à diminuição do risco de doenças crónicas (Fava et al., 2013). O baixo teor de gordura pode proporcionar um aumento de *Bifidobacterium* e uma redução do colesterol total (Annalisa et al., 2014; Singh et al., 2017). O elevado consumo de gordura pode levar ao aumento de lipopolissacarídeos e, conseqüentemente, causar distúrbios inflamatórios, obesidade e diabetes (Shanahan et al., 2017).

Por último, as proteínas de origem animal demonstraram um aumento de microrganismos tolerantes à bÍlis - como *Bacteroides*, *Alistipes* e *Bilophila* – e um aumento nos níveis de N-óxido-

trimetilamina (TMAO). O TMAO é um composto biomarcador para as doenças cardiovasculares diretamente associado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, enquanto as proteínas de origem vegetal proporcionam um aumento dos níveis de AGCC. No entanto, de forma geral, as proteínas têm sido relacionadas positivamente com a diversidade microbiana (Singh et al., 2017).

#### 1.4. Tecnologias que possibilitam o estudo do microbioma

Atualmente, as plataformas de sequenciação do ADN geram milhões de sequências que possibilitam uma caracterização detalhada da população de microrganismos presentes numa amostra, incluindo a identificação de populações minoritárias. A sequência nucleotídica do gene que codifica para a subunidade 16s do ARN ribossomal tornou-se o método mais utilizado para a caracterização da microbiota intestinal uma vez que é um dos marcadores usados para as associações filogenéticas entre organismos (Salazar et al., 2020).

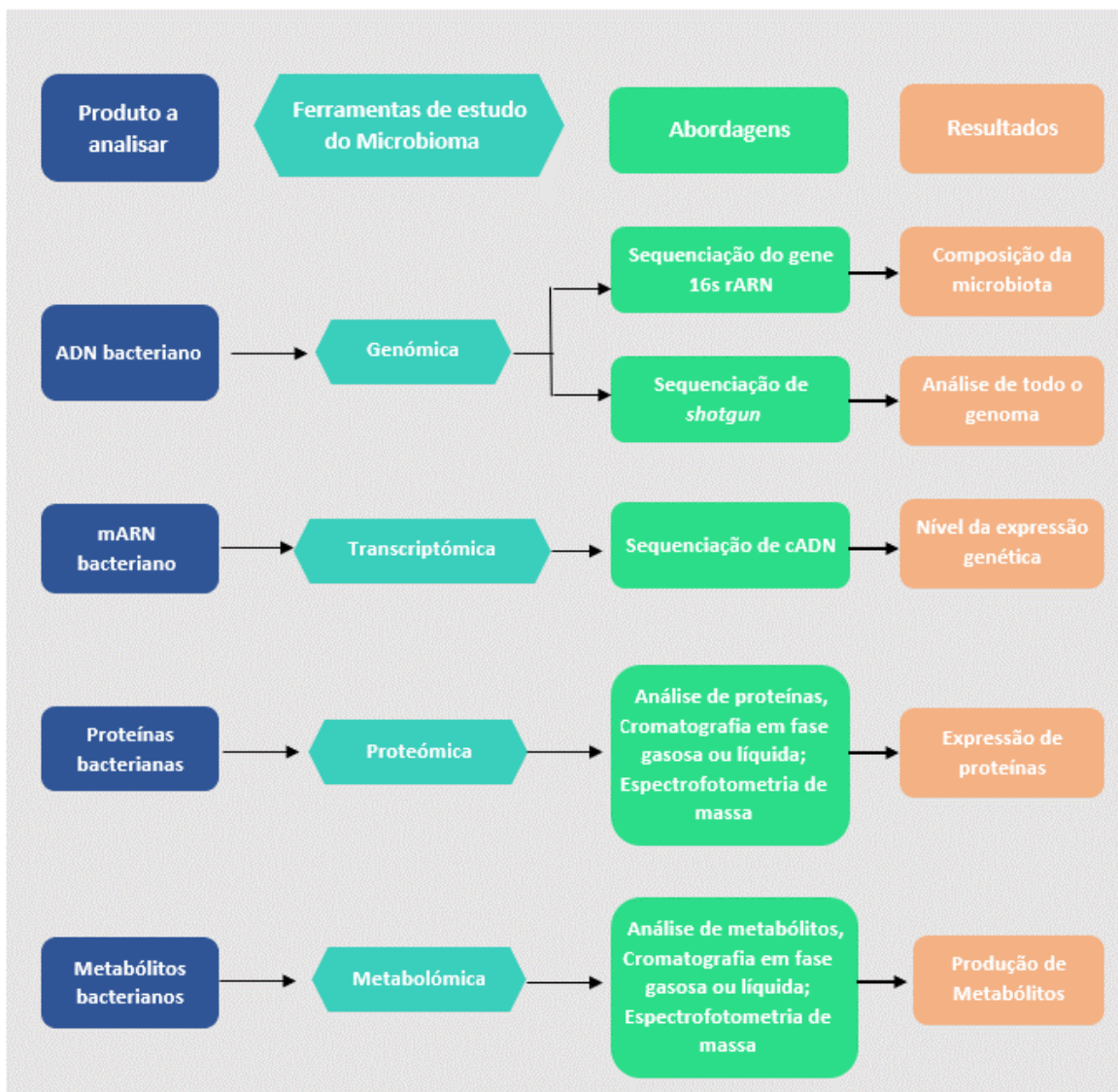
O procedimento da técnica de sequenciação de ADN baseia-se (i) no isolamento total do ADN; (ii) na amplificação por PCR, através de *primers* orientados para as regiões 16s (em procariontes) e/ou *Inter Transcribed spacer* (ITS) (em eucariontes); (iii) na sequenciação dos fragmentos amplificados; (iv) na aplicação de filtros e critérios para a exclusão de sequências ambíguas ou artificiais; (v) na confrontação das sequências obtidas com as bases de dados e o agrupamento destas em unidades taxonómicas operacionais (UTOs) (Salazar et al., 2020).

A abordagem mais recente para a sequenciação de grande quantidade de ADN é designada de *shotgun*. Este método de sequenciação muito eficaz permite que as sequências de ADN sejam analisadas em pequenos fragmentos, sequenciados individualmente, e que posteriormente são integradas num contexto genómico. Esta técnica consegue fornecer informações ao nível do genoma, possibilitando uma classificação taxonómica, e ao nível funcional/metabolismo microbiano, se a sequenciação tiver como alvo o transcriptoma (ARN/cADN) (Salazar et al., 2020; Sharpton, 2014).

Como referido anteriormente, para além da catalogação dos microrganismos presentes nas amostras em estudo, os metabólitos que produzem são cruciais para a interação entre várias populações microbianas que coexistem em determinado local e na interação destas com o hospedeiro. Deste modo, as ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica e metabolómica) constituem ferramentas essenciais para a caracterização do microbioma. A transcriptómica foca-se na descrição da atividade funcional da microbiota em determinado momento. Esta técnica baseia-

se no isolamento do mRNA e na sequenciação do cADN– um método de análise que permite caracterizar a expressão genética dos microrganismos presentes nas amostras (Salazar et al., 2020).

O estudo das proteínas (proteómica) e dos metabólitos (metabolómica) são essenciais para a compreensão das funcionalidades destes compostos (Al Khodor et al., 2017). A metabolómica permite uma melhor compreensão do processo de doença (Griffin et al., 2015), através da identificação e quantificação dos metabólitos. A proteómica consegue caracterizar as funções da microbiota intestinal através do estudo das proteínas (Salazar et al., 2020). A Figura 4 descreve sucintamente abordagens metodológicas adotadas para o estudo do microbioma.



**Figura 4** - Representação esquemática das metodologias utilizadas para o estudo do microbioma humano (Al Khodor et al., 2017).



## 1.5. O microbioma e as doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são atualmente a maior causa de mortalidade e morbidade a nível mundial, responsáveis por 45% da mortalidade na Europa, 37% da mortalidade na União Europeia e mais de 40% da mortalidade na China. A segunda maior causa é o cancro, que ocupa 20% da mortalidade (Du et al., 2019; Wilkins et al., 2017).

A prevalência destas doenças aumentou aproximadamente 50% nos últimos 10 anos (Wilkins et al., 2017), um grave problema que impõe o desenvolvimento de métodos terapêuticos e biomarcadores clínicos para o seu prognóstico. As DCV apresentam diversos fatores de risco, nomeadamente: a dieta, o tabagismo, o álcool, a pressão arterial, o sedentarismo e o colesterol.

A hipótese de que as doenças cardiovasculares estão associadas com a microbiota intestinal foi desenvolvida após a observação de uma deposição recorrente de ADN bacteriano nas placas ateroscleróticas de pacientes com DCV. Esse ADN bacteriano estava correlacionado com as espécies de bactérias presentes na cavidade oral e no intestino, o que forneceu evidências etiológicas entre a relação da microbiota e as doenças cardiovasculares (Du et al., 2019).

Os microrganismos que compõem a microbiota intestinal podem ter efeitos patogénicos ou protetores, que são identificados através de sistemas recetores de reconhecimento padrão (PRRs). Os microrganismos com efeitos protetores regulam as citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-12, IL-23) e as citocinas anti-inflamatórias (IL-10), enquanto que os microrganismos com efeitos patogénicos promovem a secreção das citocinas pró-inflamatórias no intestino a partir de células dendríticas (Barko et al., 2018).

Os metabólitos microbianos funcionam por vezes como mediadores, que ajudam na manutenção da fisiologia humana saudável; na função do sistema nervoso e imunológico e facilitam a digestão dos nutrientes alimentares (Ruan et al., 2020). Estes compostos podem ser produzidos através de diferentes microrganismos, nomeadamente as bactérias intestinais, podendo interferir com o sistema imunológico (Parolini, 2019). Os metabólitos microbianos são maioritariamente ácidos gordos de cadeia curta (AGCC); monóxido de carbono (CO); dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e sulfeto de hidrogénio gasoso (H<sub>2</sub>S) (Mohajeri et al., 2018). No entanto, os metabólitos podem ser também ácidos gordos de cadeia longa (AGCL), com a capacidade de reduzir os triglicéridos hepáticos e inibir a aterosclerose (Ruan et al., 2020), e ácidos gordos de cadeia ramificada (AGCR) – derivados de aminoácidos e proteínas que apresentam uma capacidade tóxica (Mohajeri et al., 2018).

Um metabólito produzido pela microbiota intestinal pode provocar (i) um efeito tóxico no hospedeiro, como é o caso das citotoxinas; genotoxinas e endotoxinas (lipopolissacarídeos libertados por bactérias de gram-negativa e que podem provocar uma resposta inflamatória, como por exemplo, a resistência à insulina) ou, em algumas situações, (ii) um resultado benéfico com efeitos anti-inflamatórios; antioxidantes e alívio da dor, tendo como exemplo o butirato (Annalisa et al., 2014).

### 1.5.1. Ácidos gordos de cadeia curta - AGCC

Os ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) são exemplo de metabólitos microbianos que atuam como fonte de energia para o hospedeiro, promovem a homeostase energética e a produção de glucose. Intervêm também como reguladores do sistema nervoso central e periférico, da resposta imunológica e de inflamação, e funcionam como hormonas no controlo do apetite, como é o caso do butirato (Mohajeri et al., 2018).

Os AGCC provenientes da fermentação de carboidratos e de proteínas ao nível intestinal participam na regulação imunológica e inflamação; na captura de água e sódio; na regulação do pH; na secreção da mucosa, e promovem a produção de compostos com características anti-inflamatórias (Barko et al., 2018; Parolini, 2019; Ruan et al., 2020; Weersma et al., 2020). Os ácidos gordos são transportados por células epiteliais, renais e cerebrais com uma maior abundância para butirato, acetato e propionato no intestino.

O propionato é um metabólito derivado da histidina com concentrações relativamente mais elevadas nos indivíduos com diabetes tipo 2. O propionato pode diminuir a tolerância à glucose através da inibição da sinalização da insulina por ligação aos recetores de substrato de insulina (IRS) (Koh et al., 2018). O butirato, para além das funções acima descritas, influencia no metabolismo de carboidratos e lípidos e favorece a produção de ácidos biliares (Salazar et al., 2020). Este composto é ainda responsável pela manutenção da função da barreira intestinal, através da estimulação de mucina, peptídeos antimicrobianos, proteínas e da redução do stress oxidativo (Mohajeri et al., 2018).

O acetato tem efeitos anti-inflamatórios e afeta positivamente a energia e o metabolismo do hospedeiro através da secreção de hormonas intestinais, como o peptídeo-1 e o peptídeo YY. Este AGCC aumenta o gasto de energia, a oxidação de gordura e a síntese de outros ácidos gordos através da acetilação de histonas. O acetato pode ser convertido em acetil-CoA e ser produzido por

origem microbiana ou ingerido. A produção por origem microbiana é obtida pela fermentação de fibras, como a inulina e os galactooligossacarídeos, ou da fermentação microbiana de peptídeos (Al Khodor et al., 2017; Hernández et al., 2019).

Os níveis da produção dos ácidos gordos de cadeia curta variam consoante os padrões alimentares do indivíduo (Mohajeri et al., 2018; Ruan et al., 2020; Salazar et al., 2020; Shanahan et al., 2017). Estes compostos são quantificados no organismo a partir da análise de amostras fecais por cromatografia em fase gasosa e por sequenciação *shotgun* (Claesson et al., 2012; Fava et al., 2013).

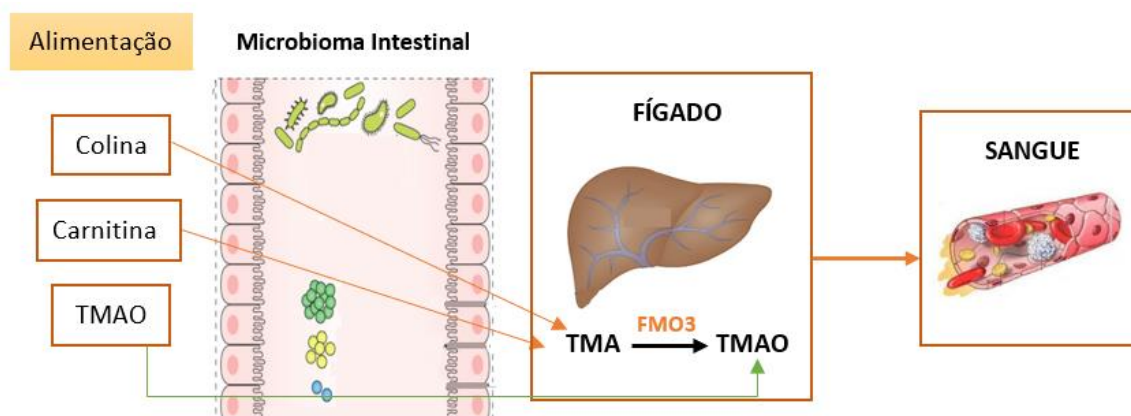
### 1.5.2. N-óxido-trimetilamina - TMAO

O TMAO é um metabólito pertencente ao grupo das aminas oxidases que tem sido associado a fatores de risco de doenças cardiovasculares, tornando-se num biomarcador destas doenças, capaz de modificar o metabolismo do colesterol e desencadear a estimulação da atividade das plaquetas – uma atividade que provoca o aumento da libertação de iões de Cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e, consequentemente, contribui para potenciais efeitos de trombose (Almeida, 2018; Tang & Hazen, 2017). O aumento da concentração do TMAO pode indicar o desenvolvimento de doença cardiovascular. Porém, essas concentrações elevadas podem estar relacionadas também com outros fatores, nomeadamente à disfunção renal causada pela aterosclerose (Canyelles et al., 2018; Zeisel & Warrier, 2017).

O TMAO é um metabólito presente nos fluídos biológicos e nos tecidos que é produzido no organismo a partir da oxidação da trimetilamina (TMA), um composto que surge no intestino após a ingestão de alimentos com L-carnitina, L-colina e L-betaína (Canyelles et al., 2018; Parolini, 2019; Zeisel & Warrier, 2017), como sejam os ovos, a carne e o peixe (Cho & Caudill, 2017). A colina e a carnitina é absorvida nos intestinos (Zeisel & Warrier, 2017) e catalisada em TMA pela enzima citocromo P450 do fígado ou da enzima TMA-liase codificada por aglomerados CUT presentes em algumas bactérias intestinais: Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria (Cho & Caudill, 2017; Griffin et al., 2015).

A TMA gerada pelo microbioma intestinal é posteriormente oxidada no fígado pela flavina monooxigenase hepática (FMO3 – enzima de metabolização xenobiótica) em TMAO (Tang et al., 2019; Tang & Hazen, 2017). A concentração de trimetilamina no organismo varia consoante os alimentos ingeridos, encontrando-se aumentada aquando da ingestão de carnes vermelhas, ovos e

marisco. Ao aumento de TMA observado após a ingestão dos alimentos referidos anteriormente, irá corresponder um dos valores de TMAO (Figura 5) (Canyelles et al., 2018; Tang et al., 2019). Alguns estudos demonstram um decréscimo dos níveis de TMAO circulantes após a ingestão de antibióticos, mas retornam ao normal com o fim do tratamento (Cho & Caudill, 2017).



**Figura 5** - Diagrama simplificado da formação de TMAO no fígado e a sua libertação na corrente sanguínea (Almeida, 2018; Tang et al., 2019). **TMAO** – N-óxido-trimetilamina; **TMA** - trimetilamina; **FMO3** – flavina monooxigenase.

Posteriormente o TMAO pode ser excretado pela urina, suor e respiração. Como representa um composto não volátil, os métodos para a avaliação dos níveis de TMAO no plasma e na urina variam entre espectrometria de massa, cromatográfica em fase líquida; cromatografia em fase gasosa e espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons (Zeisel & Warrier, 2017).

Os níveis elevados de TMAO no sangue estão associados a várias patologias cardiovasculares, nomeadamente a hipertensão e a insuficiência renal crónica. Embora nesta última patologia frequentemente sejam encontradas concentrações elevadas de TMAO na urina (Griffin et al., 2015).

Os indivíduos com doença renal crónica (DRC), insuficiência cardíaca e outras doenças cardiovasculares apresentam concentrações elevadas de TMAO (Kitai & Tang, 2017). No entanto, a sugestão de que este metabólito pode modular diretamente as vias metabólicas responsáveis pela evolução da obesidade e da resistência à insulina permanece apenas como uma possibilidade a ser explorada (Tang & Hazen, 2017).

### 1.5.3. Ácidos biliares

O teor de ácidos biliares (AB) é mediado no intestino através do metabolismo bacteriano e atuam, principalmente, no metabolismo lipídico do hospedeiro. Estes compostos estão correlacionados com processos fisiológicos e apresentam potencial para o tratamento de algumas doenças, como a doença do intestino inflamado, a síndrome metabólica e o cancro colorretal (Staley et al., 2017).

Estes metabólitos podem ser divididos em (i) primários – responsáveis pela diminuição do potencial de ruptura membranar, são sintetizados através do colesterol e conjugados no fígado com glicina ou taurina - e em (ii) ácidos biliares secundários – compostos produzidos por microrganismos intestinais através da biotransformação dos ácidos primários, nomeadamente a hidrólise de sal biliar (BSH) (Lau et al., 2017; Staley et al., 2017). Os ácidos primários são excretados no intestino delgado e enviados novamente para a circulação hepática, sendo reabsorvidos em média 95% e libertados nas fezes apenas 5% (Staley et al., 2017; Winston & Theriot, 2020). Este ciclo é moderado pelo recetor nuclear hepático FXR (recetor Farnesoid X), pelos recetores LXR (recetor do fígado X) e o recetor TGR5 na membrana. Este processo é influenciado pela BSH, ou seja, pela atividade que previne a acumulação de colesterol através do aumento da produção de AB secundários (Chong-Nguyen et al., 2017; Lau et al., 2017). Tanto o recetor FXR como o TGR5 demonstraram ter efeitos anti-inflamatórios, sendo que atuam no bloqueio da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6; IL-1; TNF- $\alpha$ ) (Al Khodor et al., 2017; Chong-Nguyen et al., 2017).

Para controlar a possível acumulação excessiva de colesterol nos tecidos periféricos, desenvolveram-se mecanismos homeostáticos internos, como é o caso do transporte inverso do colesterol (RCT). Este processo é mediado pela apolipoproteína A1 (ApoA-1) e consiste no transporte do colesterol para o fígado e a sua posterior conversão em ácidos biliares (Lau et al., 2017). Os ácidos mais predominantes nos humanos são os ácidos biliares secundários, nomeadamente o litocolato (LCA) e o desoxicolato (DCA) (Winston & Theriot, 2020).

## 1.6. O microbioma associado à diabetes e à obesidade

Apesar deste tema ser bastante abordado, existe bastante ceticismo no que diz respeito à modelação do microbioma como alvo terapêutico. Este facto pode advir da escassez de ensaios clínicos randomizados para o microbioma intestinal (Houghton et al., 2018).

As doenças cardiovasculares são provocadas por distúrbios que afetam o coração e os vasos sanguíneos, como é o caso da diabetes tipo 2 (Grice, 2015; Griffin et al., 2015). Esta doença metabólica consiste na deficiência de produção de insulina resultado de disfunções nas células  $\beta$ -pancreáticas e na resistência à insulina por parte de alguns órgãos, nomeadamente o pâncreas (células  $\beta$  e  $\alpha$ ), o fígado, o músculo esquelético, os rins, o cérebro, o intestino delgado e o tecido adiposo (Chatterjee et al., 2017; Gonai et al., 2017; Marlatt et al., 2018; Simon et al., 2015). O diagnóstico da diabetes tipo 2, nos indivíduos adultos, pode ser determinado através do peptídeo C - um marcador substituto de insulina que é secretado pelas células- $\beta$  e metabolizado nos rins - e da concentração de HbA<sub>1c</sub> (hemoglobina A<sub>1c</sub>) - um indicador no controlo glicémico produzido através da presença de hiperglicemia. A proporção da hemoglobina glicada aumenta consoante o aumento da concentração de glucose no sangue. Para que a progressão desta doença possa ser minimizada, é necessário proceder à regulação constante dos teores de lípidos e da glucose (Malta et al., 2019) (Chatterjee et al., 2017).

O excesso de peso e a obesidade são também um problema de saúde pública com acréscimo acentuado na população na última década (WHO, 2020). A obesidade é ainda um fator de risco para outras doenças, como a diabetes, a hipertensão e problemas respiratórios, como é o exemplo da asma (Bray et al., 2016; Fitzgibbon & Mills, 2020; WHO, 2020). A medida de triagem utilizada com maior frequência para avaliar o excesso de peso e a obesidade é o Índice de Massa Corporal (IMC). Este é um número que avalia o peso em relação à altura e é calculado através do quociente  $IMC = \frac{kg}{m^2}$ . Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), adultos com IMC igual ou superior a 25 são considerados acima do peso recomendado e adultos com IMC igual ou superior a 30 são classificados como obesos (WHO, 2020). No entanto, esta avaliação não é considerada como o único método de diagnóstico da obesidade. O perímetro abdominal, a pressão arterial, os níveis de glucose e os níveis de lípidos (HDL e triglicéridos) constituem outros parâmetros a considerar (Bray et al., 2016).

A diabetes e a obesidade são dois fatores de risco modificáveis para as doenças cardiovasculares, com grande incidência mundial e que afeta a qualidade de vida do indivíduo. Estes fatores podem ainda estar associados a comorbilidades, como a hipertensão; o acidente vascular cerebral (AVC) e a insuficiência cardíaca (Al Khodor et al., 2017; Yan et al., 2017). A diabetes tem uma maior relação de comorbilidade com a hipertensão e a insuficiência cardíaca, enquanto a obesidade relaciona-se com a hipertensão e o AVC (Cryer et al., 2016; Lehrke & Marx, 2017). A

obesidade, juntamente com o tabagismo, a dieta e as exposições ambientais, contribuem para uma elevada percentagem de cancro nos indivíduos (90-95%) (WHO, 2020).

## 2. Objetivos

O presente estudo pretendia proceder a uma meta-análise, no entanto os artigos disponíveis demonstram uma falta de dados quantitativos, sendo que por este motivo é apresentada uma revisão sistemática em que se relaciona o microbioma intestinal com os fatores de risco de doenças cardiovasculares, a diabetes e a obesidade.

## 3. Metodologia

A revisão da literatura nesta análise sistemática consistiu na compilação restrita de informação adquirida em artigos científicos, limitada a um período máximo de 10 anos desde a sua publicação. A pesquisa foi realizada em inglês, na National Library of Medicine (PubMed® Central, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), num período entre 2010 e fevereiro de 2021, com as seguintes palavras-chave:

- I. “gut microbiota” com um resultado superior a dez mil artigos, onde destes foram analisados os primeiros 350 artigos. A seleção deste número de artigos resultou da impossibilidade de leitura do número total no tempo de realização desta dissertação, sendo considerada uma amostra significativa.
- II. “gut microbiota cardiovascular” com 150 artigos na sua totalidade;
- III. “gut microbiota diabetes and hypertension” com um total de 8 resultados;
- IV. “gut microbiota diabetes” para um total de 74;
- V. “gut microbiota hypertension” com 9 artigos;

De forma a conseguir uma melhor canalização dos artigos para os conteúdos desejados, adicionaram-se os filtros *Books and Documents; Clinical Trial; Meta-Analysis e Associated data* para todas as palavras-chave, à exceção da pesquisa “gut microbiota”. De seguida procedeu-se à recolha dos resumos dos 591 artigos selecionados e procedeu-se à:

- I. Exclusão de 19 artigos repetidos;

- II. Exclusão de 402 artigos após a leitura dos títulos e dos resumos. Esta exclusão teve por base estudos que se distanciam da temática central, como sejam, o estudo do microbioma relacionado com a doença Alzheimer ou com o bem-estar ósseo.
- III. Adição de 4 artigos incluídos na referência bibliográfica do artigo Houghton et al., 2018.
- IV. Seleção dos artigos para a análise ficou concluída após a remoção dos 421 artigos acima referidos, e recolha da versão completa de 174 artigos. Após a leitura integral de cada um, foram excluídos 108 artigos, uma vez que:
  - a) Descreviam estudos em animais (n=16);
  - b) Não estavam escritos em língua inglesa (n=7);
  - c) Não estavam relacionados com o tema (n=44) – eram estudos que não desenvolviam o tema da diabetes e da obesidade e/ou artigos que não investigavam a microbiota nem o microbioma;
  - d) Apresentavam protocolos experimentais (n=11);
  - e) Eram artigos de revisão (n=20);
  - f) Não foi obtido acesso integral do artigo ou este não continha dados quantitativos, ou os dados quantitativos foram obtidos usando outras metodologias, cujo resultado não é comparável com a análise realizada, como a contagem de colónias em contraste com a sequenciação (n=10).

Uma vez feita a seleção dos artigos, denotou-se que o padrão de indivíduos envolvidos para os diversos estudos não era consistente, variando de grávidas, até adultos e crianças, incluindo uma ausência de pacientes com padrões de hipertensão. Desta forma, para aumentar a homogeneidade da amostra, os artigos foram novamente analisados e com base no tipo de indivíduo foram excluídos 43 artigos da seguinte forma:

- I. Artigos com mulheres grávidas (n=5);
- II. Artigos incluindo exclusivamente indivíduos saudáveis (n=13);
- III. Artigos com pacientes pré-diabéticos (n=6);
- IV. Artigos com pacientes de idade inferior a 18 anos (n=4);
- V. Artigos com pacientes com outras condições físicas excluídos (n=15).

Como resultado final obtiveram-se 23 artigos, sendo os indivíduos em estudo pacientes com diabetes tipo 2 e indivíduos com obesidade ou excesso de peso. Após a recolha e a análise dos 23 artigos, observou-se que estes se focavam no estudo do microbioma consoante o tipo de dieta e suplemento ingerido ou o resultado após a intervenção de cirurgias gástricas de bypass.



### 3.1. Critérios de Inclusão para pacientes com diabetes

Os artigos publicados foram incluídos nesta revisão sistemática quando cumpriam os seguintes critérios:

- ◇ Pacientes que tenham sido diagnosticados com diabetes tipo 2 ou diabetes mellitus tipo 2;
- ◇ Pacientes que não estejam sujeitos a tratamentos com insulina ou qualquer outro medicamento antidiabético pela cavidade oral;
- ◇ Pacientes que tenham a idade compreendida entre os 18 e os 75 anos;
- ◇ Pacientes em que o último evento de doença coronária tenha sido, pelo menos, 6 meses antes do estudo;
- ◇ Pacientes que não apresentem doenças severas

### 3.2. Critérios de Exclusão para pacientes com diabetes

Os artigos publicados foram excluídos nesta revisão sistemática quando incluíam os seguintes critérios:

- ◇ Pacientes sujeitos a medicação;
- ◇ Pacientes com disfunção severa do fígado ou histórico médico de tumores malignos;
- ◇ Pacientes com episódios anteriores de doenças no trato digestivo;
- ◇ Pacientes que tenham participado noutros ensaios clínicos nos últimos 3 a 6 meses;
- ◇ Pacientes que tenham ingerido outros probióticos ou prebióticos nos últimos 3 a 6 meses;
- ◇ Pacientes com historial médico de uso de drogas e/ou abuso de álcool;
- ◇ Pacientes sujeitos a cirurgia abdominal, doenças cardiovasculares, mau funcionamento do fígado ou do rim;
- ◇ Grávidas e fumadores;
- ◇ Qualquer outra condição que, na opinião do investigador, possa interferir com os resultados do estudo;
- ◇ Em alguns casos, a utilização de contraceptivos ou medicamentos que influenciem os níveis de glucose ou de insulina.

### 3.3. Critérios de Inclusão para pacientes com obesidade

Os artigos publicados foram incluídos nesta revisão sistemática quando cumpriam os seguintes critérios:

- ◇ Indivíduos adultos obesos (índice de massa corporal [IMC] > 27 kg/m<sup>2</sup>) sem doenças crónicas diagnosticadas;
- ◇ Pacientes em que o último evento de doença coronária tenha sido pelo menos 6 meses antes do estudo;
- ◇ Pacientes na faixa etária entre os 18 e os 75 anos;
- ◇ Pacientes sem casos de doenças graves;
- ◇ Pacientes que não tenham uma esperança de vida estimada inferior a 5 anos;

### 3.4. Critérios de Exclusão para pacientes com obesidade

Os artigos publicados foram excluídos nesta revisão sistemática quando incluíam os seguintes critérios:

- ◇ Pacientes sob medicação ou uso de antibióticos;
- ◇ Pacientes que suspeitem de hipersensibilidade a qualquer componente usado no estudo;
- ◇ Vegetarianos, grávidas e fumadores;
- ◇ Pacientes com historial médico de uso de drogas e/ou ingestão excessiva de álcool;
- ◇ Pacientes que estiveram sujeitos a outras dietas ou suplementos vitamínicos antes do estudo;
- ◇ Pacientes sujeitos a cirurgia abdominal, doenças cardiovasculares, mau funcionamento do fígado ou do rim;
- ◇ Qualquer outra condição que, na opinião do investigador, possa interferir com os resultados do estudo.

Quando uma revisão sistemática permite extrair informações quantitativas adicionais de dois ou mais estudos sobre um tópico ou uma intervenção específica pode ser caracterizada como uma meta-análise. As meta-análises sintetizam as suas conclusões a partir da aplicação de técnicas de análise estatística. Por outro lado, quando o estudo não tem nenhuma relação com estimativas é designado por revisão sistemática qualitativa. Este estudo foi desenvolvido segundo o paradigma qualitativo. Para as duas variáveis desenvolvidas neste estudo, foi utilizada uma metodologia **PICO**:

**P:** Participantes – para cada grupo de estudos, foi limitado um intervalo de idades assim como as patologias dos indivíduos.

**I:** Intervenção – suplementos dietéticos, dietas controladas, exercício e/ou cirurgias;

**C:** Comparação – comparações entre os resultados das diferentes intervenções para cada grupo de estudo;

**O:** Outcomes (desfecho) – exemplo: redução do risco da diabetes e da obesidade através da análise da microbiota intestinal; a resistência à insulina; abundância relativa da microbiota intestinal; parâmetros glicêmicos (hemoglobina (HbA<sub>1c</sub>) e modelo homeostático da resistência à insulina (HOMA-IR));

**T:** Tipologia de estudo – os artigos incluídos nesta revisão limitaram-se a estudos controlados e randomizados; a estudos que representavam ensaios clínicos ou estudos piloto.

Para que os artigos fossem incluídos nesta revisão sistemática era necessário que os mesmos seguissem determinados critérios previamente estabelecidos: investigações empíricas que avaliassem o efeito da microbiota intestinal nas doenças cardiovasculares, descrição dos métodos utilizados e possuir um grupo de amostragem com população na fase adulta (mais de 18 anos) com obesidade, excesso de peso ou diabetes tipo 2.

#### 4. Resultados

Ao fim de uma pesquisa abrangente e da remoção de artigos duplicados, artigos que representavam uma revisão sistemática e de artigos que não abordavam os temas desejados, foram mantidos 23 estudos que relatam algumas medidas de prevenção para indivíduos com diabetes tipo 2 e para indivíduos com obesidade. Na sua maioria, os processos estudados referem-se a intervenções alimentares, não excluindo a metodologia da prática do exercício físico e, nos casos mais graves, da cirurgia. Infelizmente não foi possível encontrar coerência entre os vários estudos, uma vez que as alterações quantitativas ou qualitativas dos metabólitos não são referidas, assim como a percentagem relativa dos microrganismos que compõem a microbiota intestinal, o que impossibilitou a meta-análise.

De seguida iremos abordar os diferentes artigos consoante o tema de estudo: pacientes com obesidade ou pacientes com diabetes tipo 2.

Procedeu-se a uma avaliação da qualidade dos métodos para cada estudo, nomeadamente o uso e a clareza dos critérios de inclusão e exclusão, a indicação do desenho de estudo, as características da amostra e os métodos de recolha e de análise. De forma a obter uma amostra o mais homogénea possível, agruparam-se os diversos estudos consoante a dieta ou o suplemento em análise.

Na tabela 2 sistematiza-se a informação contida nos 23 artigos selecionados, no que diz respeito ao tipo de estudo, à patologia associada, à intervenção realizada, ao tamanho da amostra e ao género dos indivíduos.

**Tabela 2** - Enumeração e descrição prévia dos artigos selecionados para esta revisão sistemática.

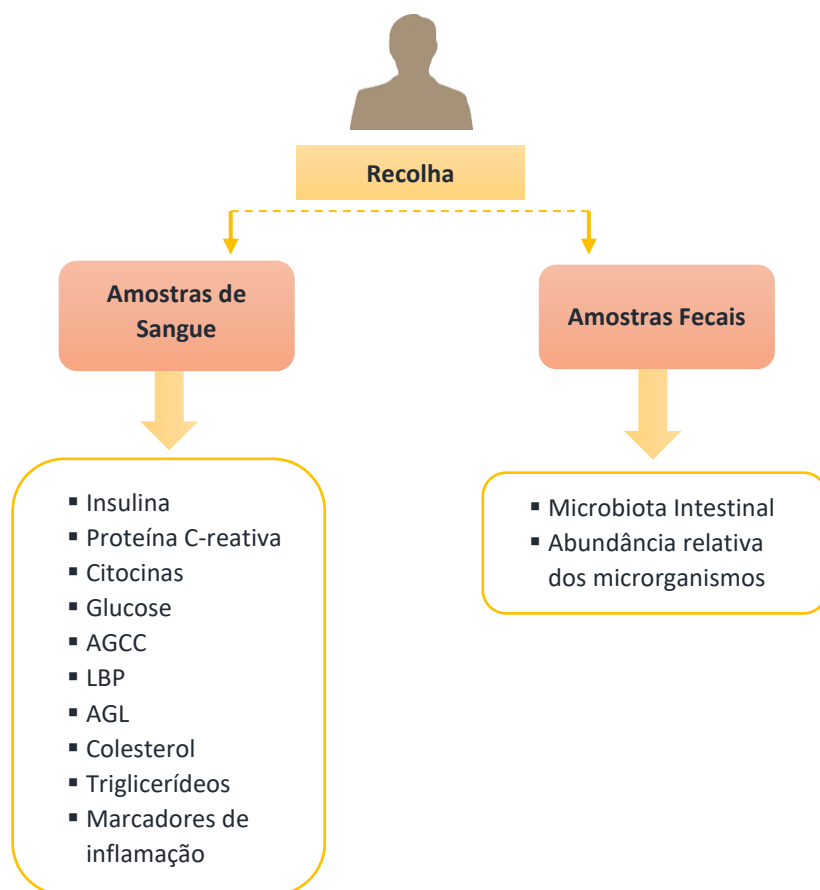
<b>Autor/ Ano</b>	<b>Intervenção</b>	<b>Tipo de estudo</b>	<b>Tamanho da Amostra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Patologia</b>
<b>Andreasen et al., 2010</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (probiótico)	Duplo-cego randomizado	45	Homens	Diabetes
<b>Balfegó et al., 2016</b>	Dieta rica em omega-3 (sardinha)	Ensaio piloto randomizado	35	Ambos	Diabetes
<b>Candela et al., 2016</b>	Dieta Ma-Pi 2 vs Dieta standard	Ensaio clínico aberto e controlado	56	Ambos	Diabetes/Obesidade
<b>Canfora et al., 2017</b>	Galactooligossacarídeos	Duplo-cego, controlado por placebo, randomizado	46	Ambos	Obesidade
<b>Elbere et al., 2018</b>	Metformina	Estudo exploratório	18	Ambos	Diabetes
<b>Firouzi et al., 2017</b>	Probiótico multi-estirpes	Ensaio clínico randomizado	136	Ambos	Diabetes
<b>Gonai et al., 2017</b>	Galactooligossacarídeos	Ensaio duplo-cego controlado	55	Ambos	Diabetes
<b>González-Sarrías et al., 2017</b>	Extrato de romã	Ensaio clínico duplo-cego randomizado, controlado por placebo	49	Ambos	Obesidade

<b>González-Sarrías et al., 2018</b>	Extrato de romã	Ensaio clínico randomizado	49	Ambos	Obesidade
<b>Haro et al., 2016</b>	Dieta mediterrânea vs dieta LFHCC	Ensaio randomizado, aberto e controlado em pacientes com doença cardíaca coronária	20	Ambos	Obesidade
<b>Lee et al., 2019</b>	Cirurgia bariátrica	Ensaio piloto randomizado e controlado	15	Mulheres	Diabetes e Obesidade
<b>Liu et al., 2020</b>	Eficácia do exercício físico	Ensaio clínico randomizado	39	Homens	Diabetes
<b>Napolitano et al., 2014</b>	Metformina	Ensaio clínico randomizado	14	Ambos	Diabetes
<b>Palleja et al., 2016</b>	Cirurgia bypass	Ensaio de análise de coorte	13	Ambos	Obesidade
<b>Pedersen et al., 2016</b>	Galactooligosacarídeos	Ensaio duplo cego randomizado, controlado por placebo	29	Homens	Diabetes
<b>Pisanu et al., 2020</b>	Dieta mediterrânea hipocalórica	Ensaio clínico randomizado	23	Ambos	Obesidade
<b>Sasaki et al., 2013</b>	Ingestão de Transglucosidase	Ensaio duplo cego randomizado, controlado por placebo	60	Ambos	Diabetes
<b>Sato et al., 2017</b>	<i>Lactobacillus casei</i> (probiótico)	Ensaio randomizado controlado	70	Ambos	Diabetes
<b>Serena et al., 2018</b>	Níveis de ácido succínico	Artigo de Análise de Coorte Prospetiva	156	Ambos	Obesidade
<b>Simon et al., 2015</b>	<i>Lactobacillus reuteri</i> (probiótico)	Ensaio duplo-cego randomizado, prospetivo, piloto	21	Ambos	Diabetes/ Obesidade
<b>Soare et al., 2014</b>	Dieta Ma-Pi 2 vs Dieta standard	Ensaio clínico randomizado e controlado	51	Ambos	Diabetes

<b>Vulevic et al., 2013</b>	Trans- galactooligosacarídeos	Ensaio clínico duplo- cego, randomizado, controlado por placebo (maltodextrina)	45	Ambos	Obesidade
<b>Zhang et al., 2020</b>	Probióticos vs Beberina	Ensaio clínico duplo- cego, randomizado, controlado por placebo	381	Ambos	Diabetes

#### 4.1. Plano para análise de indivíduos com obesidade

Os estudos descritos foram realizados em indivíduos obesos, com IMC superior a 25 kg/m<sup>2</sup>, com idades compreendidas entre os 18 e os 75 anos, sendo na sua maioria adultos entre os 45 e os 60 anos. Em todos os estudos que incluíram um grupo placebo, foi administrado maltodextrina em doses variadas. Todos os estudos realizaram dois tipos de recolha: as amostras fecais e as amostras de sangue. As amostras fecais foram recolhidas da parte da manhã, em jejum, com o objetivo de analisar a microbiota intestinal e a variação da abundância relativa dos microrganismos. As amostras de sangue foram utilizadas para avaliar os níveis iniciais de insulina, a proteína C-reativa (PCR), os marcadores de inflamação – como os lipopolissacarídeos, IL-6, IL-8, alta-sensibilidade a PCR (PCR-as) e fatores de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a citocina, a glucose, os ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), as proteínas de ligação a polissacarídeos (LBP), os ácidos gordos livres (AGL), o colesterol total, o colesterol HDL, o colesterol LDL e os triglicérides. Os artigos demonstraram um tempo de intervenção coerente, sendo na sua maioria 3 ou 6 meses, à exceção das cirurgias gástricas de bypass, que mantiveram um acompanhamento de aproximadamente 1 ano (Figura 6).



**Figura 6** - Esquema representativo dos parâmetros analisados para cada amostra recolhida, em jejum, de indivíduos com obesidade ou excesso de peso. **AGCC** – ácidos gordos de cadeia curta; **LBP** – proteínas de ligação a lipopolissacarídeos; **AGL** – ácidos gordos livres.

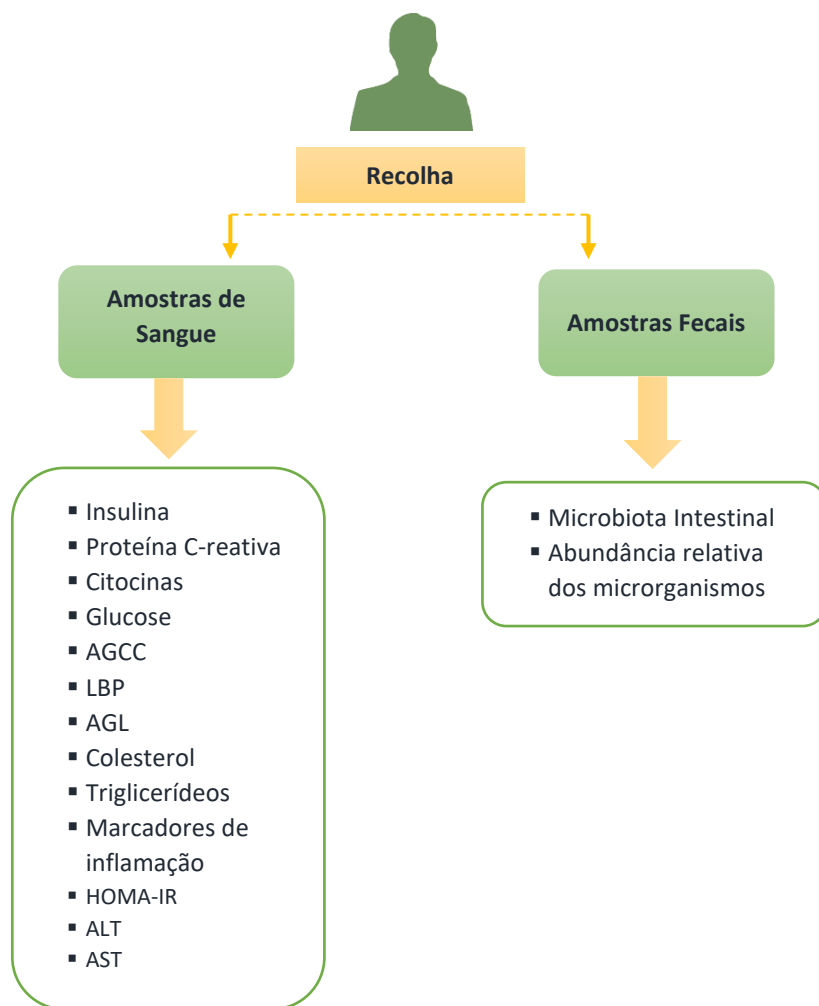
As amostras fecais foram colhidas pelos próprios pacientes, colocadas no frio a temperaturas de 4/5°C, e entregues posteriormente no local de análise, onde foram armazenadas à temperatura de -80°C. De seguida, as amostras foram homogeneizadas para a extração do ADN total e posterior sequenciação 16S rARN.

#### 4.2. Plano para análise de indivíduos com diabetes

À semelhança do que aconteceu com o grupo anterior, foram seleccionados 12 artigos exclusivamente dedicados ao estudo da diabetes e 3 artigos que associam a diabetes com a obesidade. Apenas 2 estudos não apresentam um grupo de controlo/placebo, no entanto os períodos de intervenção entre os estudos são muito variados – na maioria completam as 4 semanas, 3 ou 6 meses. Estes ensaios tiveram como participantes indivíduos com diabetes tipo 2 (e pré-

diabéticos para 1 caso), com idades entre os 20 e os 75 anos, recorrendo à mesma metodologia utilizada nos pacientes obesos.

Para além dos parâmetros relatados acima, as amostras de sangue destes indivíduos foram utilizadas para a avaliação da homeostase – resistência à insulina (HOMA-IR), da hemoglobina (HbA<sub>1c</sub> com valores de aproximadamente 7-8%), da alanina aminotransferase (ALT) e do aspartato aminotransferase (AST) – Figura 7. Em 2 estudos foram ainda realizados testes orais à glucose.

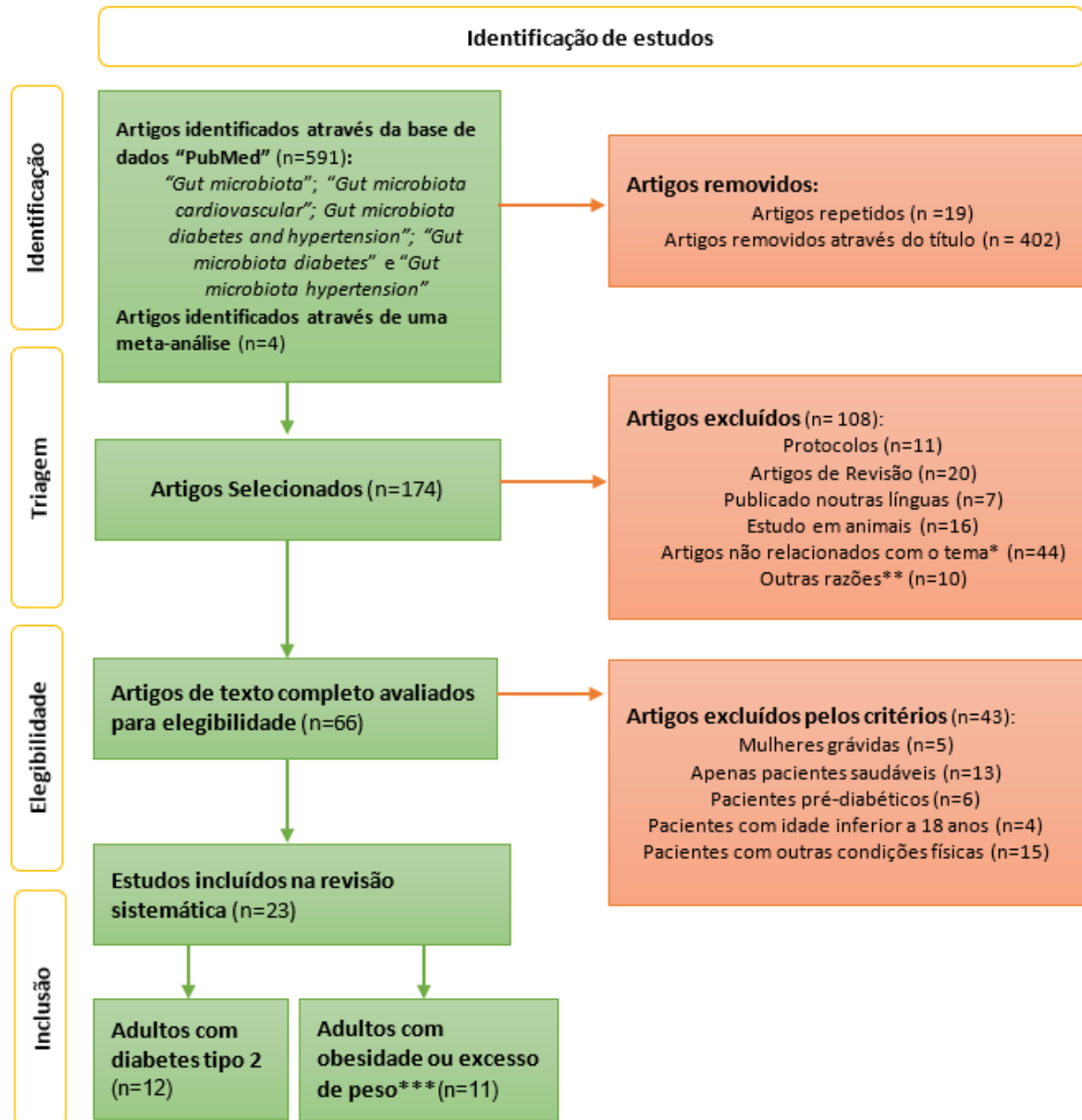


**Figura 7** - Esquema representativo dos parâmetros analisados para cada amostra recolhida, em jejum, de indivíduos com diabetes tipo 2. **AGCC** – ácidos gordos de cadeia curta; **LBP** – proteínas de ligação a lipopolissacarídeos; **AGL** – ácidos gordos livres; HOMA-IR – avaliação da homeostase – resistência à insulina; **AST** – aspartato aminotransferase; **ALT** – alanina aminotransferase.

Em conformidade com o procedimento adotado nos estudos com pacientes obesos, as amostras fecais foram recolhidas pelos indivíduos e seguiram os mesmos métodos de recolha e armazenamento. Foi avaliada a variação das características basais entre os diferentes grupos



(controlo Vs intervenção) através de análises estatísticas usando o teste ANOVA e, em dois artigos o coeficiente de correlação de Spearman. Os resultados desta análise são validados entre -1 (quando uma variável aumenta a outra diminuí, proporcionalmente), +1 (as duas variáveis aumentam, proporcionalmente) e 0 (ausência de relação linear).



**Figura 8** - Fluxograma PRISMA que representa o processo realizado para a identificação dos estudos elegíveis.

\*artigos que não contemplam o estudo da diabetes tipo 2 e/ou na obesidade; artigos que não analisam a microbiota nem o microbioma intestinal.

\*\*artigos sem acesso gratuito; artigos sem dados quantitativos para nenhum dos parâmetros (microrganismos e metabólitos) analisados; artigos com resultados baseados na contagem de colónias.

\*\*\* 3 artigos que têm como alvo de estudo adultos com diabetes tipo 2 e adultos com obesidade ou excesso de peso, em simultâneo.

Os artigos que possuíam dados quantitativos relativos à composição da população microbiana nas amostras analisadas, mostraram uma ausência de dados normalizados, nomeadamente artigos com diferentes medidas (mediana, média, valores de p-value, Z-score) e artigos com diferentes métodos de contagem de organismos (contagem de colónias; meios de cultura e sequenciação de ADN). Os estudos que continham valores quantitativos para os metabolitos microbianos, verificou-se a ausência de unidades de medida padrão. Em suma, a grande maioria das publicações apenas tornam disponível dados tratados, muitas vezes sob a forma de figura, impossibilitando o acesso aos dados originais e deste modo, impedindo a reutilização dos mesmos para estudos comparativos ou para verificação das conclusões dos próprios estudos.

### 4.3. Indivíduos com obesidade

Vários estilos de intervenção foram estudados para os indivíduos que apresentam obesidade. Nesta revisão foram abordadas a dieta mediterrânea (dieta Med); uma dieta com baixo teor de gordura e alto teor em carboidratos (LFHCC); dieta Ma-Pi 2; suplementação com galactooligossacarídeos (GOS); suplementação com probióticos (*Lactobacillus*); suplementação com extrato de romã; avaliação do ácido succínico e cirurgias bariátricas bypass (BGRY).

Haro *et al.* (2016) compararam uma dieta mediterrânea com uma dieta de baixo teor de gordura e alto teor em complexos de carboidratos. Neste artigo não foram observadas diferenças significativas nas variáveis metabólicas para nenhuma das dietas. A nível das alterações dos microrganismos presentes no microbioma intestinal, a dieta Med apresentou uma diminuição apenas para o género *Prevotella*, enquanto que foram registados aumento das abundâncias relativas de *Roseburia*, *Oscillospira*, *Parabacteroides distasonis* e de alguns géneros responsáveis pela produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), tendo por fim um aumento da sensibilidade da insulina nos indivíduos obesos. É importante salientar que a *Prevotella* tem a capacidade de extrair oligossacarídeos e carboidratos. Para a intervenção da dieta LFHCC observou-se um aumento de *Prevotella* e de *Faecalibacterium prausnitzii*, uma diminuição de *Roseburia* e uma inalteração de *Oscillospira*. Por fim, a dieta LFHCC demonstrou ter uma afinidade para facilitar a fermentação de carboidratos e um aumento da produção de AGCC que resultou numa melhoria da sensibilidade à insulina para os pacientes em estudo.

Pisanu *et al.* (2020) avaliou também os efeitos da dieta Med em indivíduos obesos em comparação com um grupo de controlo de indivíduos saudáveis. Neste estudo, observou-se um aumento da Proteobacteria, *Sphingobacterium shayense*, *Bacteroides uniformis*, *Prevotella stercorea*, *Coprococcus eutactus*, *Catenibacterium* e *Veillonella*. Em contrapartida, os valores de *Sutterella*, *Ruminococcus*, *Pseudobutyrvibrio*, *Megamonas* e *Roseburia* sofreram uma diminuição significativa para o grupo de estudo. Em relação aos resultados das vias metabólicas, os indivíduos obesos apresentaram um aumento de LBP e uma diminuição das funções relacionadas ao transporte de membrana e da mortalidade celular, um efeito que tem sido muito associado à obesidade e à síndrome metabólica. Por fim, os resultados foram positivos, pois obteve-se uma redução do peso corporal, da massa gorda, IMC e redução da circunferência da cintura.

Canfora *et al.* (2017) estudaram a suplementação com galactooligossacarídeos e observaram alterações significativas dos valores de *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Bacteroides stercoris* e *Sutterella wadsworthia* e aumento de *Bifidobacterium*. Em relação aos parâmetros metabólicos, não houve diferenças estatisticamente significativas. Ao contrário do que se esperava, o grupo GOS não apresentou alteração dos valores de sensibilidade da insulina, HOMA-IR, IMC, peso corporal ou de massa gorda em comparação com o grupo placebo.

Vulevic *et al.* (2013) avaliaram os efeitos da suplementação com trans-galactooligossacarídeos nos indivíduos obesos onde, ao fim de 12 semanas de intervenção, verificaram uma diminuição da concentração de calprotectina e de PCR plasmática. Por outro lado, não foram observados efeitos na produção de citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ). Nos resultados da microbiota intestinal, a trans-galactooligossacarídeo aumentou a quantidade de bifidobactérias presentes nas fezes dos indivíduos obesos, enquanto que estes apresentaram uma tendência da diminuição da *Desulfovibrio* e das  $\beta$ -Proteobacteria à medida que o tempo de exposição prolonga. Os pacientes que participaram neste estudo evidenciaram uma diminuição das concentrações de insulina ao fim de 6 semanas e dos valores de colesterol total após as 12 semanas. Estes mesmos efeitos não foram observados a partir do grupo placebo.

Gonzalez-Sarrías *et al.* (2017) procederam a dois estudos para observar quais as alterações provocadas pelo extrato de romã nos indivíduos obesos. No primeiro estudo verificaram mudanças positivas nos biomarcadores cardiovasculares dos indivíduos UM-B e um aumento acentuado da concentração de urolithin nos extratos fecais do grupo UM-A, em comparação com o UM-B. O grupo UM-B apresentou um aumento significativo das bactérias *Gordonibacter*, *Bacteroides* e *Escherichia coli*, e uma redução na abundância de *Bifidobacteria* e de géneros bacterianos

responsáveis pela produção de ácido láctico. No segundo estudo, Gonzalez-Sarrías *et al.* (2018), a concentração de LBP diminuiu enquanto os valores de colesterol LDL e as PCR-as aumentaram nos indivíduos com excesso de peso. Na microbiota intestinal, os autores registaram o aumento do filo *Bacteroidetes* e a diminuição dos filos Firmicutes e Euryarchaeota. Os extratos fecais dos indivíduos indicaram o aumento de *Faecalibacterium*, de *Roseburia*, de *Bacteroides* e dos produtores de butirato, e a diminuição de *Clostridium sensu stricto*, da *Doera*, da *Anaerostipes* e da *Romboutsia*. Outros géneros frequentemente avaliados, como as *Bifidobacterium*, a *Akkermansia* e a *Blautia* não sofreram alteração na sua abundância relativa.

Simon *et al.* (2015) analisou os efeitos do probiótico *Lactobacillus reuteri* em indivíduos com obesidade e em indivíduos saudáveis. Nos indivíduos saudáveis observaram o aumento dos níveis de GLP-1 e GLP-2 no fim do período de intervenção, enquanto os indivíduos obesos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para as características antropométricas, nem para a composição da microbiota intestinal. Desta forma, o grupo de indivíduos obesos não revelou qualquer alteração na sensibilidade à insulina durante e após a intervenção.

Candela *et al.* (2016) exploraram os efeitos da dieta Ma-Pi 2 em indivíduos diagnosticados com obesidade e diabetes tipo 2. A implementação desta dieta reduziu os valores de HOMA-IR, do colesterol total, do colesterol LDL, da TNF- $\alpha$  plasmática, da IL-6 e dos níveis de PCR. No campo da microbiota intestinal, os indivíduos que seguiram a dieta Ma-Pi 2 apresentaram diminuição de *Bifidobacterium*, da *Collinsella*, da *Roseburia*, da *Lachnospira* e dos *Streptococcus*, e um aumento de *Bacteroides*, de *Dorea*, de *Faecalibacterium*, da *Oscillospira* e da *Akkermansia*.

Palleja *et al.* (2016) estudaram a implicação da cirurgia tipo bypass na microbiota intestinal. Após 3 meses da cirurgia BGRY, os indivíduos apresentaram diminuição significativa do IMC, da glucose em jejum, da insulina em jejum e dos níveis de HbA<sub>1c</sub>. No intestino destes indivíduos, os autores encontraram uma relação da abundância relativa entre *Actinomyces odontolyticus* e a *Fusobacterium nucleatum*, à medida que a concentração de *Prevotella* diminuía. A intervenção da cirurgia BGRY provocou um aumento exponencial das bactérias *Escherichia coli* e da *Klebsiella pneumoniae* logo após o término, enquanto as bactérias *Streptococcus*, *Veillonella*, *Alistipes*, *Bifidobacterium dentium*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, e *Akkermansia muciniphila* aumentaram de forma mais gradual. Lee *et al.* (2019) também avaliaram os riscos da cirurgia RYBG em comparação com mais dois grupos: (i) cirurgia de banda gástrica (BGA) e (ii) o grupo de perda de peso médica (PPM). Neste estudo os autores observaram a diminuição da diversidade microbiana no grupo BGA enquanto os indivíduos dos 2 grupos restantes tiveram um

aumento da composição da microbiota. A bactéria *Faecalibacterium* aumentou no grupo BGRY enquanto que a *Roseburia* aumentou no grupo PPM. Por fim, a *Akkermansia* aumentou em proporções semelhantes nos 3 grupos de estudo. Não foram registadas alterações para os parâmetros metabólicos nem para as características antropométricas.

Por último, Serena *et al.* (2018) estudaram a eficiência do ácido succínico na fermentação, que resultou no aumento da abundância relativa das famílias *Prevotellaceae* e *Veillonellaceae*, e diminuição da *Odoribacteraceae* e da *Clostridaceae*. Estes autores conseguiram observar também uma associação entre a diminuição dos níveis de TMAO e a inibição do género *Prevotella*.

Na Tabela 3 podemos observar um resumo de todos os artigos que foram essenciais para a realização desta revisão sistemática, para o tema da obesidade.

**Tabela 3** - Resumo dos artigos selecionados para a análise sistemática em indivíduos com obesidade e/ou excesso de peso e os seus respetivos objetivos e resultados.

Autor e Ano	Intervenção	Idade média (anos)	Objetivo	Resultado
Canfora <i>et al.</i> , 2017	Suplementação com galactooligosacarídeos	51-66	Os efeitos a longo-prazo da suplementação com galactooligosacarídeos na composição da microbiota intestinal e do metabolismo humano em indivíduos com obesidade	Aumento significativo de <i>Bifidobacterium</i> , sem diferenças nas concentrações de AGCC e nos marcadores de inflamação. Não houve mudanças significativas da sensibilidade da insulina e do metabolismo energético.
González-Sarrías <i>et al.</i> , 2017	Suplementação com extrato de romã	40-65	Investigar se os fenótipos de metabolização derivados de microrganismos influenciam os efeitos no consumo de extrato de romã, em indivíduos com obesidade	UM-A apresentou maior concentração de Uro-A nas fezes. UM-B apresentou valores de risco para lípidos, colesterol total e LDL, mas demonstrou melhores valores para alguns marcadores cardiovasculares após a toma do extrato de romã.
González-Sarrías <i>et al.</i> , 2018	Suplementação com extrato de romã	40-65	Associação entre a modulação da microbiota intestinal e a proteína LBP, em indivíduos com obesidade.	Diminuição significativa para LBP. Aumento da abundância de microrganismos importantes, como os <i>Bacteroides</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Butyricoccus</i> , <i>Odoribacter</i> e <i>Butyricimonas</i> . Após a segunda dose de PE, diminuição de <i>Parvimonas</i> , <i>Methanobrevibacter</i> e <i>Methanophaera</i> .
Haro <i>et al.</i> , 2015	Dieta mediterrânea versus dieta com baixo teor de gordura e elevado teor em carboidratos	58-68	Quais foram as alterações observadas na microbiota intestinal após um ano de administração de cada dieta em indivíduos obesos	Dieta LFHCC aumentou as concentrações de <i>Prevotella</i> e <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> e diminuiu a <i>Roseburia</i> . A dieta Med diminuiu as concentrações de <i>Prevotella</i> e aumentou as <i>Parabacteroides distasonis</i> , <i>Roseburia</i> e <i>Oscillospira</i> .

Lee <i>et al.</i> , 2019	Cirurgia bariátrica	43-60	Avaliar as diferenças do microbioma intestinal após uma cirurgia bariátrica versus perda de peso médico	Aumento da abundância relativa de espécies bacterianas para o grupo cirúrgico. Aumento da <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> em todos os grupos, mas com destaque no grupo cirúrgico.
Pallela <i>et al.</i> , 2016	Cirurgia bypass	>20	Quais as mudanças na função e na composição microbiana intestinal após cirurgia	Diversidade microbiana aumentos 3 meses após a cirurgia, alteração das abundâncias relativas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Veillonella spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Alistipes spp.</i> e <i>Akkermansia muciniphila</i> .
Pisanu <i>et al.</i> , 2020	Dieta mediterrânea versus dieta com baixo teor de gordura e elevado teor em carboidratos	38-62	Avaliar o impacto da dieta mediterrânea na microbiota intestinal em indivíduos com obesidade.	Redução de peso e massa gorda. Aumento das abundâncias relativas de <i>Bacteroides spp.</i> e <i>Prevotella stercorea</i> e diminuição de <i>Sutterella</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Veillonellaceae</i> , <i>Catenibacterium</i> , <i>Megamonas</i> e algumas <i>Lachnospiraceae</i> .
Serena <i>et al.</i> , 2018	Níveis do ácido succínico		Analisar os níveis sistêmicos de succinato na obesidade e a sua relação com o microbioma intestinal.	Aumento da abundância relativa das famílias <i>Prevotellaceae</i> e <i>Veillonellaceae</i> , e diminuição das famílias <i>Odoribacteraceae</i> e <i>Clostridaceae</i> .
Simon <i>et al.</i> , 2015	Suplementação com <i>Lactobacillus reuteri</i>	42-58	Investigar a probabilidade da ingestão de <i>Lactobacillus reuteri</i> alterar a microbiota intestinal, a resistência à insulina e o desenvolvimento da diabetes	Aumento da liberação de GLP-1 e GLP-2; da secreção de insulina devido à liberação de incretina. No entanto houve uma inalteração da sensibilidade à insulina.
Vulevic <i>et al.</i> , 2013	Suplementação com trans-galactooligosacarídeos	30-57	Avaliar o efeito de galactooligosacarídeos nos marcadores de síndrome metabólica, na microbiota intestinal e na função imunológica.	$\beta$ -GOS aumentou o número de bifidobactérias fecais e diminuição da proteína C-reativa, insulina, colesterol total e triglicérides. Gerou um efeito positivo na composição da microbiota, da resposta imunológica e das concentrações de insulina, TC e TG.

**UM-A:** grupo de indivíduos com metabolito A; **UM-B:** grupo de indivíduos com metabolito B ///  
**Uro-A:** urolithin A

#### 4.4. Indivíduos com Diabetes

À semelhança do que acontece com os indivíduos com obesidade, os pacientes com diabetes tipo 2 foram sujeitos a ensaios randomizados com a intervenção de dietas com suplementação de ômega-3, suplementação com probióticos *Lactobacillus*, dieta Ma-Pi 2, suplementação com metformina, suplementação de GOS e a suplementação de beberina (BBR). O estudo randomizado da prática de exercício físico e da realização de uma cirurgia tipo bypass foram também observados.

Andreasen *et al.* (2010) estudaram o efeito do probiótico *Lactobacillus acidophilus* NCFM na sensibilidade à insulina. Na microbiota intestinal os autores depararam-se com o aparecimento de *Lactobacillus acidophilus* nas fezes de indivíduos que não apresentavam valores detetáveis inicialmente. No caso dos metabolitos não se observou alterações das concentrações plasmáticas, no entanto, o estudo proporcionou aos pacientes uma melhor sensibilidade à insulina. Sato *et al.* (2017) foram outros autores que estudaram também a suplementação de probióticos, mas desta vez com *Lactobacillus casei*. O estudo ocorreu durante 16 semanas e foi possível observar a diminuição dos ácidos orgânicos totais e do ácido butírico no grupo de intervenção em comparação com os valores iniciais. A PCR-as demonstrou também um aumento no grupo do probiótico e os valores de HbA<sub>1c</sub> aumentou para ambos os grupos – probiótico e placebo. Os resultados dos microrganismos demonstraram que a *Lactobacillus* atingiu um número mais elevado para o grupo de intervenção, com uma maior afinidade dos *Lactobacillus casei*; *Clostridium coccoides* e *Clostridium leptum* – bactérias com respiração anaeróbia obrigatórias. Para além destas, no grupo de controlo evidenciou-se uma associação dos valores de *Bifidobacterium*; *Lactobacillus* total; *Lactobacillus fermentum* e *Atopobium cluster* consoante os valores de *Prevotella* eram alterados - à medida que a *Prevotella* diminuía as suas concentrações, as restantes bactérias atingiam valores cada vez mais elevados. Por último, Zhang *et al.* (2020) empenharam-se também nos efeitos dos probióticos e da beberina em indivíduos com diabetes tipo 2. A beberina é um composto proveniente da protobeberina, um extrato de plantas frequentemente utilizado para reduzir o colesterol, os triglicéridos e os níveis de glucose no sangue. Desta forma, os autores dividiram os seus pacientes em vários grupos consoante a sua suplementação: Beberina e Probióticos (Prob + BBR); Apenas Beberina (BBR) e Apenas Probióticos (Prob). O grupo BBR foi o que demonstrou melhores resultados de HbA<sub>1c</sub>; colesterol total e dos níveis de glicémia plasmática em jejum, enquanto que o HOMA-IR demonstrou valores significativamente menores apenas para o grupo Prob + BBR. Nos microrganismos presentes no intestino, apenas se observou um aumento de *Bacteroides spp.* e um esgotamento dos produtores de AGCC; de *Roseburia spp.*; *Ruminococcus bromii*; *Faecalibacterium prausnitzii* e *Bifidobacterium spp.* no grupo BBR.

Firouzi *et al.* (2017) exploraram a suplementação com probióticos no controlo da glucose, mas desta vez com probióticos multi-estirpes. A nível da microbiota intestinal, as *Bifidobacterium* aumentaram apenas no grupo de controlo enquanto as *Lactobacillus spp.* aumentaram para ambos os grupos. Os valores antropométricos sofreram uma redução para a HbA<sub>1c</sub>, HOMA-IR e insulina nos pacientes do grupo de intervenção. Através deste estudo, os autores concluíram que a

suplementação com este tipo de probióticos é benéfica e que proporcionou um melhor controle da glucose nos indivíduos em estudo.

Elbere *et al.* (2018) e Napolitano *et al.* (2014) investigaram ambos o efeito da metformina, mas para dois grupos de indivíduos, que eram respectivamente: pacientes saudáveis e pacientes diabéticos. Para o primeiro estudo, apenas a microbiota intestinal revelou resultados estatisticamente significativos. A metformina reduziu a diversidade do microbioma intestinal mas provocou um aumento da abundância relativa de microrganismos patogênicos oportunistas, como foi o caso da *Escherichia-Shigella spp.*. Ao fim de 7 dias da administração de metformina (2 × 850 mg/dia) as amostras fecais dos participantes revelaram um aumento da abundância de *Enterobactérias*, *Akkermansia*, *Blautia* e *Streptococcus* e uma diminuição acentuada para *Ruminiclostridium*. No segundo estudo (Napolitano *et al.*, 2014), os indivíduos fizeram uma ingestão de metformina de  $\geq 1000$  mg/dia durante 3 meses. Neste estudo, os ácidos biliares apresentaram valores finais semelhantes aos valores iniciais, no entanto, ao fim de 7 dias de administração de metformina, aumentaram quase para o dobro. Após o fim do período de administração, os ácidos biliares totais aumentaram significativamente. Na composição da microbiota intestinal, os autores referem apenas um aumento do filo *Actinobacteria* e uma diminuição do filo Firmicutes.

Balfegó *et al.* (2016) exploraram o efeito de uma dieta rica em ômega-3, através da inclusão de sardinhas na alimentação dos indivíduos com diabetes tipo 2. O grupo de intervenção de sardinhas apresentou redução dos valores de insulina em jejum e de HOMA-IR enquanto o grupo controle não obteve alterações significativas. A nível das alterações da microbiota intestinal, ambos os grupos (controle e intervenção) proporcionaram maiores concentrações de *Escherichia coli*. O aumento da ingestão de ômega-3 promoveu o aumento das proporções de *Bacteroides-Prevotella* nos indivíduos do grupo de intervenção.

Soare *et al.* (2014) estudaram quais as alterações benéficas que a dieta Ma-Pi 2 pode proporcionar nos indivíduos com diabetes. Os indivíduos que realizaram a dieta apresentaram uma redução de colesterol total; colesterol LDL e reduções ainda mais acentuadas para HbA<sub>1c</sub> e HOMA-IR. Os pacientes sofreram uma perda de peso corporal e uma diminuição dos níveis de IMC e de glicemia em jejum em ambos os grupos, sendo que o grupo de intervenção teve uma maior alteração dos dados do que o grupo controle.

Gonai *et al.* (2017) e Pedersen *et al.* (2016) analisaram a suplementação com galactooligossacarídeos, e em ambos os casos não foram identificadas diferenças significativas para os valores antropométricos. No estudo pertencente a Gonai *et al.* (2017) a microbiota intestinal foi



avaliada apenas a nível das famílias das bactérias, onde estes autores registaram um aumento consecutivo das *Bifidobacteriaceae* ao longo da administração de GOS e uma diminuição de *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae* e *Porphyromonadaceae* no fim das 4 semanas de intervenção. No caso do Pedersen *et al.* (2016) o tratamento com fibras levou a algumas mudanças estatisticamente significativas da composição da microbiota em comparação com o grupo placebo. As *Bifidobacterium* aumentaram para ambos os grupos, com valores ligeiramente mais elevados para o grupo de intervenção. A nível dos metabólitos, apenas Gonai *et al.* (2017) registou um aumento de alanina aminotransferase e de aspartato aminotransferase para o grupo GOS. Sasaki *et al.* (2013) procuraram averiguar qual o efeito da suplementação com transglucosidase, onde obtiveram um aumento dos níveis de HbA<sub>1c</sub> e de IMC no grupo placebo. Os indivíduos com diabetes tipo 2, apresentaram redução de *Clostridium cluster* e *Clostridium subcluster XIV*, aumento de Lactobacillales e *Bifidobacterium* e uma melhora significativa do peso corporal e dos níveis de glicémia após a administração com transglucosidase.

Liu *et al.* (2020) pesquisaram quais os efeitos da prática do exercício físico em indivíduos diagnosticados com pré-diabetes. Os pacientes em estudo foram divididos de acordo com a sua resposta à diminuição de HOMA-IR. Assim, a amostra foi diferenciada em indivíduos que “respondem” e em indivíduos que “não-respondem”, sendo os primeiros o grupo que apresentou uma maior diminuição de HOMA-IR. Este grupo de indivíduos exibiram uma redução de *Bacteroides*; *Xilansolvans*; *Alistipes putredinis*; *Prevotella copri* e um aumento de *Streptococcus mitis* e *Lachnospiraceae*. O grupo “correspondentes” expressou um aumento da capacidade de biossíntese de AGCCs e de GABA proporcionando, posteriormente, um aumento das abundâncias fecais de propionato e de GABA para estes indivíduos. Por outro lado, os indivíduos que “não-respondem” tiveram uma redução de aproximadamente 70% de *Ruminococcus gnavus* e um acréscimo dos valores de *Alistipes shahii* e, de outros microrganismos envolvidos na produção de derivados fenólicos e sulfato de aminoácidos aromáticos.

Na Tabela 4 pode ser observado um resumo dos artigos essenciais à realização desta análise sistemática, para os indivíduos com diabetes tipo 2.

**Tabela 4** - Resumo dos artigos selecionados para a análise sistemática em indivíduos com diabetes tipo 2 e os seus respetivos objetivos e resultados.

Autor e Ano	Intervenção	Idade média (anos)	Objetivo	Resultado
Andreasen <i>et al.</i> , 2010	Suplementação com probiótico <i>Lactobacillus acidophilus</i>	50-60	O efeito de <i>Lactobacillus acidophilus</i> na sensibilidade à insulina e na resposta inflamatória sistêmica	O tratamento com estirpes <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM, ao fim de 4 semanas, pareceu melhorar a sensibilidade à insulina em indivíduos com diabetes tipo 2; mas não afetou a resposta inflamatória
Balfegó <i>et al.</i> , 2016	Dieta enriquecida em omega-3	56-64	O efeito da dieta enriquecida com sardinha no controle metabólico, na inflamação e na microbiota intestinal	Efeitos neutros no controlo glicémico em pacientes com diabetes tipo 2; efeitos benéficos para o risco cardiovascular; diminuição de HOMA-IR e alteração da composição da microbiota intestinal
Candela <i>et al.</i> , 2016	Dieta macrobiótica Ma-Pi 2	42-74	As modulações de disbiose da microbiota intestinal em pacientes diabéticos tipo 2	Dieta Ma-Pi 2 foi eficaz em neutralizar grupos pró-inflamatórios, com possível eficácia no controlo metabólico; aumento da diversidade do ecossistema de produtores de AGCCs
Elbere <i>et al.</i> , 2018	Administração de metformina	18-35	O efeito a curto prazo, da administração de metformina na microbiota intestinal em indivíduos saudáveis	A metformina gerou uma redução significativa da microbiota e aumento da abundância relativa da <i>Escherichia-Shigella spp.</i> nas primeiras 24h. Após uma semana de intervenção, a microbiota intestinal aumentou ligeiramente.
Firouzi <i>et al.</i> , 2017	Suplementação com probióticos multi-estirpes	43-62	Qual o efeito de probióticos multi-estirpes no controlo glicémico em indivíduos com diabetes	Observou-se um aumento da HbA <sub>1c</sub> e uma diminuição dos valores de insulina em jejum para o grupo de intervenção.
Gonai <i>et al.</i> , 2017	Suplementação com galactooligosacarídeos	40-60	Observar se o prebiótico GOS é capaz de melhorar o declínio das <i>Bifidobacteriaceae</i> em indivíduos com diabetes	As abundâncias das <i>Bifidobacteriaceae</i> , Clostridiales e <i>Peptostreptococcaceae</i> foram significativamente menores para o grupo de intervenção, assim como as concentrações para o ácido butanoico. Não foram observadas diferenças significativas para os AGCCs.
Lee <i>et al.</i> , 2019	Cirurgia bariátrica	43-60	Avaliar as diferenças do microbioma intestinal após uma cirurgia bariátrica versus perda de peso médico	Aumento da abundância relativa de espécies bacterianas para o grupo cirúrgico. Aumento da <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> em todos os grupos, mas com destaque no grupo cirúrgico.

Liu <i>et al.</i> , 2020	Prática de exercício físico	32-46	A eficácia do exercício físico para a prevenção de diabetes	Aumento da produção de AGCCs e da quebra de AGCR para o grupo "respondem" e um aumento da produção de compostos metabólicos prejudiciais para o grupo "não-respondem". Os níveis de insulina e glucose em jejum diminuiram para o grupo "respondem".
Napolitano <i>et al.</i> , 2014	Administração de metformina	51-61	Caracterizar os mecanismos intestinais após a administração de metformina em indivíduos com diabetes	Metformina demonstrou alterar o perfil do microbioma intestinal, alterar hormonas intestinais e ativar receptores de ácido biliar. A ausência de metformina reduziu os níveis de GLP-1.
Pedersen <i>et al.</i> , 2016	Suplementação de galactooligosacarídeos	55-60	Quais as ligações do hospedeiro-microbioma para a permeabilidade intestinal, tolerância à glucose e bactérias intestinais em indivíduos com diabetes	Não houve efeito significativo para a permeabilidade intestinal, a glucose em jejum, a insulina nem para marcadores inflamatórios. Não foram observadas mudanças significativas na abundância relativa de espécies quando comparado com o grupo placebo.
Sasaki <i>et al.</i> , 2013	Suplementação com transglucosidase	52-72	Avaliar a eficácia da transglucosidase na regulação da glucose e no ganho de peso em indivíduos com diabetes	Populações de <i>Lactobacillales</i> e <i>Bifidobacterium</i> aumentaram significativamente, diminuição dos níveis de glicémia e controlo no ganho de peso.
Sato <i>et al.</i> , 2017	Suplementação com probiótico <i>Lactobacillus casei</i>	55-73	Investigar a probabilidade de os probióticos reduzirem a translocação bacteriana e causar alterações na microbiota intestinal	<i>Lactobacillus</i> e <i>Lactobacillus casei</i> foram significativamente mais abundantes. Diminuição das concentrações de ácido butírico e uma menor contagem de bactérias intestinais no sangue. Os níveis de HbA <sub>1c</sub> e glucose em jejum aumentaram ligeiramente.
Simon <i>et al.</i> , 2015	Suplementação com <i>Lactobacillus reuteri</i>	42-58	Investigar a probabilidade da ingestão de <i>Lactobacillus reuteri</i> alterar a microbiota intestinal, a resistência à insulina e o desenvolvimento da diabetes	Aumento da libertação de GLP-1 e GLP-2; da secreção de insulina devido à libertação de incretina. No entanto houve uma inalteração da sensibilidade à insulina.
Soare <i>et al.</i> , 2014	Dieta macrobiótica Ma-Pi 2	62-70	O efeito da dieta macrobiótica Ma-Pi 2 versus dietas padrões para indivíduos com diabetes	Maior diminuição da glicémia em jejum, da resistência à insulina, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL e HbA <sub>1c</sub> no grupo Ma-Pi 2 em comparação com o grupo de controlo.

zhang <i>et al.</i> , 2020	Suplementação de probióticos e beberina	42-61	Investigar o possível efeito antidiabético da beberina em indivíduos com diabetes	Redução do HbA <sub>1c</sub> , aumento da HOMA-IR. Alteração significativa da microbiota intestinal, esgotando os microrganismos responsáveis pela produção de açúcar e AGCCs, como a <i>Roseburia spp</i> , <i>Ruminococcus bromii</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> e a <i>Bifidobacterium spp</i> .
-------------------------------	---	-------	---	---

## 5. Discussão

Esta análise sistemática engloba o estudo de duas doenças metabólicas, obesidade e diabetes tipo 2, com padrão de inflamação crônica nos indivíduos que normalmente está associada a uma atividade deficiente e desregulação da insulina. Estas inflamações têm sido cada vez mais associadas a práticas alimentares menos boas, como é o exemplo de dietas ricas em gordura e pobres em fibras que podem provocar efeitos pró-inflamatórios.

Os estudos incluídos nesta revisão contêm um grupo de amostra reduzido (grupo de pessoas diminuto), têm um período de intervenção curto e apresentam números desproporcionais de homens e/ou mulheres, o que dificultou a generalização dos resultados. Nesta análise foi possível observar de que modo as alterações no estilo de vida podem afetar, positivamente ou negativamente, o homem. A intervenção do tipo de dieta, da prática de exercício físico e a execução de cirurgias bariátricas demonstraram ter um papel importante na regulação da microbiota intestinal.

Neste tema, a meta-análise seria um estudo imprescindível para o avanço de novas correlações entre o microbioma e as alterações nas doenças cardiovasculares. Infelizmente não foi viável a sua realização, pelo que os resultados acima descritos são, maioritariamente, retirados através de valores qualitativos ou, em alguns estudos, de valores quantitativos de microrganismos e/ou dos metabólitos. Os poucos artigos que disponibilizam os dados da investigação, na maioria das vezes não estão harmonizados, o que dificulta no processo de comparação dos valores. No entanto, os estudos que não disponibilizam os resultados exatos descrevem uma noção estatisticamente significativa para cada parâmetro avaliado. Os diferentes métodos de sequenciação de rARN 16S e os diferentes níveis de nutrição entre as dietas incluídas foi outro obstáculo que dificultou a compreensão geral.

Os artigos com intervenções dietéticas presentes nesta revisão mostraram mudanças significativas na composição da microbiota que afetou as abundâncias relativas em diferentes ordens taxonômicas: filos, famílias, gêneros, espécies e razões entre algumas bactérias, como é o caso da *Bacteroides:Prevotella* para a dieta rica em ômega-3. Para além das alterações nos taxas dos microrganismos, observou-se também correlações entre algumas bactérias e variáveis metabólicas, como é o caso dos níveis de glicemia em jejum. Alguns mecanismos foram também relacionados com alterações da composição bacteriana no indivíduo, nomeadamente: o aumento de lipólises (LPS – componentes associados a inflamações de baixo grau, ou seja, inflamação sistêmica metabólica), a inflamação e a alteração dos níveis de peptídeos (Glucagon-1 e Glucagon 2). A compreensão do significado das relações entre microrganismos e metabólitos ainda é um pouco limitada.

As alterações alimentares dos indivíduos em estudo foram associadas à tentativa de preservar a homeostase intestinal e à capacidade de melhorar o controlo dos níveis de glucose no sangue, em adultos com diabetes. As suplementações comumente utilizadas correspondem a probióticos e prebióticos genéricos. A suplementação com *Lactobacillus* ou Bifidobacterias demonstrou resultados positivos para os indivíduos com obesidade, excesso de peso e síndrome metabólica. Este resultado deve-se à ausência de LPS na membrana celular das bactérias *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. A redução de Bifidobacterias na microbiota intestinal, como acontece nas dietas ricas em gordura, provoca no indivíduo um aumento de peso excessivo (Houghton et al., 2018).

A suplementação com trans-galactooligosacarídeos proporcionou uma fermentação seletiva dos prebióticos no intestino resultando no aumento de *Bifidobactérias*, na diminuição de bactérias gram-negativas menos benéficas na microbiota fecal e numa resposta positiva do sistema imunológico nos indivíduos com excesso de peso. Os estudos que demonstraram a suplementação com galactooligosacarídeos apresentaram um aumento das espécies de *Bifidobacterium*, no entanto não houve alterações significativas dos biomarcadores inflamatórios sistêmicos, da concentração de AGCC, da composição da microbiota nem dos metabólitos. Esta suplementação deveria aumentar, significativamente, as concentrações de acetato de forma a proporcionar efeitos metabólicos. A ausência deste resultado pode ser explicada por uma possível eliminação do acetato no fígado, da conversão do acetato noutros metabólitos ou até mesmo do local de fermentação do GOS (Canfora et al., 2017). No artigo de Gonai *et al.* (2017) foi possível verificar que a suplementação com GOS proporcionou aos pacientes com diabetes tipo 2 uma restauração da

abundância relativa de *Bifidobacteriaceae*, o que nos indica que este prebiótico tem um efeito positivo na microbiota intestinal.

A suplementação com probióticos *Lactobacillus* levou à modulação da secreção da insulina, de C-peptídeo e ao aumento de peptídeos intestinais, como o GLP-1 e GLP-2, nos indivíduos tolerantes à glucose. O aumento de GLP-1 é uma possível explicação para o aumento de secreção da insulina (Simon et al., 2015). As *Lactobacillus* foram associadas a uma menor liberação de TNF induzida pelos LPS e podem apresentar efeitos anti-inflamatórios. No entanto, esses efeitos dependem muito da cepa que foi escolhida para o tratamento (Andreasen et al., 2010).

As dietas LFHCC provocaram uma diminuição de *Roseburia* e um aumento da abundância relativa de *Prevotella* (uma bactéria com a capacidade de aumentar a extração de calorias em oligossacarídeos e amido resistente) e *Faecalibacterium prausnitzii*, uma espécie produtora de butirato que está comumente presente em pequenas quantidades nos indivíduos diagnosticados com diabetes. Estas alterações proporcionaram aos indivíduos em estudo uma melhor sensibilidade à insulina. Por outro lado, as dietas Med aumentaram a abundância de *Oscillospira* e de *Roseburia* - uma bactéria produtora de AGCC com uma função importante na saúde intestinal devido ao seu efeito anti-inflamatório. Nos indivíduos com diabetes tipo 2, a *Roseburia* apresenta baixas concentrações. A dieta Med tem sido também associada à baixa taxa de mortalidade de pacientes com doenças cardiovasculares (Haro et al., 2016). Estes resultados demonstram que tanto a dieta Med como a dieta LFHCC podem ser uma estratégia para a prevenção da diabetes tipo 2.

A dieta rica em omega-3 através da ingestão de sardinhas foi um estudo com uma densidade amostral muito pequena e sem outros artigos para comparação dos resultados. No entanto, esta dieta mostrou diminuir os níveis de insulina e de HOMA-IR, um fator que pode estar relacionado com o aumento do consumo de fibras pelos indivíduos do grupo de intervenção (Balfegó et al., 2016).

A dieta Ma-Pi 2 demonstrou capacidade em regular disbioses na microbiota intestinal e em reduzir os valores de glucose no sangue, em jejum e após uma refeição, de reduzir o colesterol total, a PCR e a IL-6 em pacientes com diabetes tipo 2. Esta dieta proporcionou um aumento de *Bacteroides*, *Dorea* e *Faecalibacterium* - importantes produtores de butirato e propionato no intestino; aumento de *Akkermansia* (bactéria associada a um melhor perfil metabólico), e neutralizou a produção de *Collinsella* e *Streptococcus* (microrganismos com efeitos pró-inflamatórios). No entanto, Candela et al. (2016) depararam-se com uma associação negativa entre a *Faecalibacterium* e as concentrações de glucose no sangue em jejum. Neste estudo foi possível

observar também uma diminuição particular de alguns biomarcadores de disbiose, como foi o caso do metabolismo da alanina e da biossíntese de açúcar (Candela et al., 2016). Soare *et al.* (2014) observaram uma maior redução nos níveis de glucose em jejum e pós-prandial, redução da homeostase HOMA-IR, da HbA<sub>1c</sub>, do IMC e do perímetro abdominal nos indivíduos com excesso de peso ou com obesidade e diabetes tipo 2, sem simultâneo. A dieta Ma-Pi 2 exibiu os melhores valores para o controlo do colesterol, um resultado que pode estar associado ao aumento de ingestão de cereais integrais (Soare et al., 2014).

A perda de peso com o auxílio das cirurgias é conhecida pela rápida alteração da microbiota intestinal nos pacientes (Lee et al., 2019). Os estudos que abordaram as cirurgias com banda gástrica apresentaram aumento na abundância relativa de Proteobacteria, apesar da diminuição geral na diversidade e riqueza da microbiota intestinal. As cirurgias tipo bypass aumentaram a abundância de Actinobacteria e Proteobacteria, assim como a diversidade da microbiota intestinal. Os indivíduos sujeitos a BGRY apresentaram também um aumento de *Faecalibacterium*, uma bactéria muito benéfica pelo seu efeito anti-inflamatório e pela sua possível capacidade de aumentar a sensibilidade à insulina através da secreção de GLP-1.

Os estudos sobre as alterações provocadas pela prática do exercício físico ou sedentarismo foram um pouco limitados. Esta intervenção no estilo de vida demonstrou provocar alteração na microbiota intestinal, com impactos positivos nos efeitos anti-inflamatórios. No entanto, são necessários mais estudos bem delimitados sobre a intervenção de exercício físico. Independentemente deste procedimento provocar, ou não, perda de peso nos indivíduos com diabetes tipo 2 e obesidade, estes tiveram resultados positivos no controlo da glucose e na composição corporal.

Esta análise sistemática cedeu dados informativos suficientes para demonstrar que a dieta tem um papel fulcral na regulação da microbiota intestinal, o que vem a apoiar avanços clínicos importantes e a importância que as intervenções do estilo de vida nos indivíduos com diabetes e/ou obesidade tem na modulação da microbiota intestinal.

## 6. Análise Crítica

As meta-análises são um modelo de estudo muito importante para comparação e relação de vários fatores a ser analisados. Contudo, a escassez de informações quantitativas e a grande heterogeneidade entre os diferentes estudos que abordam o mesmo tema, permitiu apenas uma

correlação entre estas interações humanas e bacterianas de forma qualitativa. Deste modo, os resultados obtidos permitem apenas comprovar os efeitos benéficos das alterações no estilo de vida em indivíduos com obesidade e/ou diabetes tipo 2, mas não torna possível obter novos avanços clínicos.

A maioria dos estudos aqui incluídos optaram pela sequenciação de rARN 16s, um método frequentemente utilizado para identificar bactérias presentes nas amostras biológicas. No entanto, este método de baixo custo oferece informações sobre quais os microrganismos presentes nos extratos fecais, mas não sobre a função destes no hospedeiro. Para contornar este problema, a utilização de abordagens metagenômicas de *shotgun* é uma solução. A *shotgun* consegue sequenciar todo o genoma bacteriano e não apenas uma porção, como acontece no método anterior. Infelizmente esta técnica tem um custo mais elevado e necessita de uma maior capacidade informática, mas poderá ser uma futura ferramenta dominante para o estudo das funcionalidades do microbioma.

Desta forma, foi possível atribuir uma resposta positiva à hipótese de estudo, no entanto é de extrema necessidade uma maior harmonização dos dados presentes nos artigos para o apuramento de respostas mais concretas e minuciosas. Para além desta falta de coerência, é ainda necessário apelar aos autores uma maior inclusão dos resultados quantitativos nos seus estudos, mesmo quando estes possam apresentar valores negativos ou nulos. A obtenção desses valores, que não são esperados, tem também grande importância e impacto para conclusões científicas.

## 7. Conclusão

Esta revisão sistemática apresentou resultados que permitem concluir que as intervenções no estilo de vida têm um forte potencial para melhorar a microbiota intestinal, o controlo da glucose e a sensibilidade à insulina. Os avanços realizados nos estudos de microbiomas, desde a última década, proporcionaram novas ferramentas com a possibilidade de melhorar a saúde humana e de tratamentos terapêuticos para o combate destas doenças.

Para que o potencial da microbiota possa ser aproveitado ao máximo, é necessário a realização de estudos futuros que ponderem um maior grupo amostral, assim como o período de intervenção e o período de acompanhamento ao indivíduo após as intervenções, de forma a conseguirem analisar se as alterações benéficas providenciadas durante o tempo de intervenção são mantidas após este terminar.



Está claro que as alterações no estilo de vida aqui referidas podem desempenhar um papel benéfico, no entanto o motivo específico pelo qual alguns indivíduos respondem mais intensamente às intervenções do que outros, e qual o papel da microbiota intestinal neste processo são duas questões ainda sem resposta fixa e clara.

Uma melhor compreensão da relação entre o hospedeiro-micróbio e das interações entre os diferentes genes com o microbioma será uma importante descoberta para determinar uma futura utilidade na medicina com maior precisão.

## 8. Referências bibliográficas

- Al Khodor, S., Reichert, B., & Shatat, I. F. (2017). The microbiome and blood pressure: Can microbes regulate our blood pressure? *Frontiers in Pediatrics*, 5(June), 1–12.  
<https://doi.org/10.3389/fped.2017.00138>
- Almeida, C. R. F. (2018). *A influência do microbioma humano nas doenças cardiovasculares*. 68.
- Andreasen, A. S., Larsen, N., Pedersen-Skovsgaard, T., Berg, R. M. G., Mller, K., Svendsen, K. D., Jakobsen, M., & Pedersen, B. K. (2010). Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 104(12), 1831–1838. <https://doi.org/10.1017/S0007114510002874>
- Annalisa, N., Alessio, T., Claudette, T. D., Erald, V., Antonino, D. L., & Nicola, D. D. (2014). *Gut Microbioma Population : An Indicator Really Sensible to Any Change in Age , Diet , Metabolic Syndrome , and Life-Style. 2014*.
- Balfegó, M., Canivell, S., Hanzu, F. A., Sala-Vila, A., Martínez-Medina, M., Murillo, S., Mur, T., Ruano, E. G., Linares, F., Porras, N., Valladares, S., Fontalba, M., Roura, E., Novials, A., Hernández, C., Aranda, G., Sisó-Almirall, A., Rojo-Martínez, G., Simò, R., & Gomis, R. (2016). Effects of sardine-enriched diet on metabolic control, inflammation and gut microbiota in drug-naïve patients with type 2 diabetes: A pilot randomized trial. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0245-0>
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 9–25.  
<https://doi.org/10.1111/jvim.14875>

- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, *8*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bray, G. A., Frühbeck, G., Ryan, D. H., & Wilding, J. P. H. (2016). Management of obesity. *The Lancet*, *387*(10031), 1947–1956. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00271-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00271-3)
- Candela, M., Biagi, E., Soverini, M., Consolandi, C., Quercia, S., Severgnini, M., Peano, C., Turrioni, S., Rampelli, S., Pozzilli, P., Pianesi, M., Fallucca, F., & Brigidi, P. (2016). Modulation of gut microbiota dysbioses in type 2 diabetic patients by macrobiotic Ma-Pi 2 diet. *British Journal of Nutrition*, *116*(1), 80–93. <https://doi.org/10.1017/S0007114516001045>
- Canfora, E. E., van der Beek, C. M., Hermes, G. D. A., Goossens, G. H., Jocken, J. W. E., Holst, J. J., van Eijk, H. M., Venema, K., Smidt, H., Zoetendal, E. G., Dejong, C. H. C., Lenaerts, K., & Blaak, E. E. (2017). Supplementation of Diet With Galacto-oligosaccharides Increases Bifidobacteria, but Not Insulin Sensitivity, in Obese Prediabetic Individuals. *Gastroenterology*, *153*(1), 87-97.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.03.051>
- Canyelles, M., Tondo, M., Farr, M., Carles, J., & Blanco-vaca, F. (2018). *Trimethylamine N -Oxide : A Link among Diet , Gut Microbiota , Gene Regulation of Liver and Intestine Cholesterol Homeostasis and HDL Function*. <https://doi.org/10.3390/ijms19103228>
- Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The Lancet*, *389*(10085), 2239–2251. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2)
- Cho, C. E., & Caudill, M. A. (2017). Trimethylamine-N-Oxide: Friend, Foe, or Simply Caught in the Cross-Fire? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *28*(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.10.005>
- Chong-Nguyen, C., Duboc, H., & Sokol, H. (2017). The gut microbiota, a new cardiovascular risk factor? *Presse Medicale*, *46*(7-8P1), 708–713. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.06.005>
- Claesson, M., Connor, M. O., Harris, H. M. B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., Sullivan, O. O., Fitzgerald, G. F., Deane, J., Connor, M. O., Harnedy, N., Connor, K. O., Mahony, D. O., Sinderen, D. Van, Wallace, M., Brennan, L., Stanton, C., Marchesi, J. R., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., ... Toole, P. W. O. (2012). *Gut microbiota composition correlates with diet and*

*health in the elderly*. <https://doi.org/10.1038/nature11319>

- Cryer, M. J., Horani, T., & Dipette, D. J. (2016). Diabetes and Hypertension: A Comparative Review of Current Guidelines. *Journal of Clinical Hypertension*, *18*(2), 95–100. <https://doi.org/10.1111/jch.12638>
- Cuervo, A., Valde, L., Salazar, N., Reyes-gavila, C. G. D. L., Gueimonde, M., & Gonza, S. (2014). *Pilot Study of Diet and Microbiota: Interactive Associations of Fibers and Polyphenols with Human Intestinal Bacteria*.
- Davenport, E. R., Sanders, J. G., Song, S. J., Amato, K. R., Clark, A. G., & Knight, R. (2017). The human microbiome in evolution. *BMC Biology*, *15*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0454-7>
- Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., & Blaser, M. J. (2019). Role of the microbiome in human development. *Gut*, *68*(6), 1108–1114. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317503>
- Du, Y., Li, X., Su, C., Wang, L., Jiang, J., & Hong, B. (2019). The human gut microbiome—a new and exciting avenue in cardiovascular drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *14*(10), 1037–1052. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1638909>
- Elbere, I., Kalnina, I., Silamikelis, I., Konrade, I., Zaharenko, L., Sekace, K., Radovica-Spalvina, I., Fridmanis, D., Gudra, D., Pirags, V., & Klovins, J. (2018). Association of metformin administration with gut microbiome dysbiosis in healthy volunteers. *PLoS ONE*, *13*(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204317>
- Fava, F., Gitau, R., Griffin, B. A., Gibson, G. R., Tuohy, K. M., & Lovegrove, J. A. (2013). The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome ‘at-risk’ population. *International Journal of Obesity*, *January 2012*, 216–223. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.33>
- Ferrer, M., Méndez-García, C., Rojo, D., Barbas, C., & Moya, A. (2017). Antibiotic use and microbiome function. *Biochemical Pharmacology*, *134*, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.007>
- Firouzi, S., Majid, H. A., Ismail, A., Kamaruddin, N. A., & Barakatun-Nisak, M. Y. (2017). Effect of multi-strain probiotics (multi-strain microbial cell preparation) on glycemic control and other diabetes-related outcomes in people with type 2 diabetes: a randomized controlled trial.

*European Journal of Nutrition*, 56(4), 1535–1550. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1199-8>

- Fitzgibbon, G., & Mills, K. H. G. (2020). The microbiota and immune-mediated diseases: Opportunities for therapeutic intervention. *European Journal of Immunology*, 50(3), 326–337. <https://doi.org/10.1002/eji.201948322>
- Gibbs, R. A. (2020). The Human Genome Project changed everything. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 575–576. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0275-3>
- Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
- Gonai, M., Shigehisa, A., Kigawa, I., Kurasaki, K., Chonan, O., Matsuki, T., Yoshida, Y., Aida, M., Hamano, K., & Terauchi, Y. (2017). Galacto-oligosaccharides ameliorate dysbiotic Bifidobacteriaceae decline in Japanese patients with type 2 diabetes. *Beneficial Microbes*, 8(5), 705–716. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0230>
- González-Sarrías, A., García-Villalba, R., Romo-Vaquero, M., Alasalvar, C., Örem, A., Zafrilla, P., Tomás-Barberán, F. A., Selma, M. V., & Espín, J. C. (2017). Clustering according to urolithin metabotype explains the interindividual variability in the improvement of cardiovascular risk biomarkers in overweight-obese individuals consuming pomegranate: A randomized clinical trial. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(5), 1–14. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600830>
- González-Sarrías, A., Romo-Vaquero, M., García-Villalba, R., Cortés-Martín, A., Selma, M. V., & Espín, J. C. (2018). The Endotoxemia Marker Lipopolysaccharide-Binding Protein is Reduced in Overweight-Obese Subjects Consuming Pomegranate Extract by Modulating the Gut Microbiota: A Randomized Clinical Trial. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(11), 1–10. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800160>
- Grice, E. A. (2015). The intersection of microbiome and host at the skin interface: Genomic- and metagenomic-based insights. *Genome Research*, 25(10), 1514–1520. <https://doi.org/10.1101/gr.191320.115>
- Griffin, J. L., Wang, X., & Stanley, E. (2015). Does Our gut microbiome predict cardiovascular risk? A review of the evidence from metabolomics. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 8(1),

187–191. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000219>

Gupta, V. K., Paul, S., & Dutta, C. (2017). *Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity*. 8(June).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>

Haro, C., Montes-Borrego, M., Rangel-Zúñiga, O. A., Alcalá-Díaz, J. F., Gamez-Delgado, F., Pérez-Martínez, P., Delgado-Lista, J., Quintana-Navarro, G. M., Tinahones, F. J., Landa, B. B., Lapez-Miranda, J., Camargo, A., & Pérez-Jiménez, F. (2016). Two healthy diets modulate gut microbial community improving insulin sensitivity in a human obese population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(1), 233–242. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3351>

Hernández, M. A. G., Canfora, E. E., Jocken, J. W. E., & Blaak, E. E. (2019). The short-chain fatty acid acetate in body weight control and insulin sensitivity. *Nutrients*, 11(8).

<https://doi.org/10.3390/nu11081943>

Houghton, D., Hardy, T., Stewart, C., Errington, L., Day, C. P., Trenell, M. I., & Avery, L. (2018). Systematic review assessing the effectiveness of dietary intervention on gut microbiota in adults with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 61(8), 1700–1711.

<https://doi.org/10.1007/s00125-018-4632-0>

Kitai, T., & Tang, W. H. W. (2017). The Role and Impact of Gut Microbiota in Cardiovascular Disease. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 70(10), 799–800.

<https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.04.007>

Koh, A., Molinaro, A., Ståhlman, M., Khan, M. T., Schmidt, C., Mannerås-Holm, L., Wu, H., Carreras, A., Jeong, H., Olofsson, L. E., Bergh, P. O., Gerdes, V., Hartstra, A., de Brauw, M., Perkins, R., Nieuwdorp, M., Bergström, G., & Bäckhed, F. (2018). Microbially Produced Imidazole Propionate Impairs Insulin Signaling through mTORC1. *Cell*, 175(4), 947-961.e17.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.055>

Larsen, J. M. (2017). The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 151(4), 363–374. <https://doi.org/10.1111/imm.12760>

Lau, K., Srivatsav, V., Rizwan, A., Nashed, A., Liu, R., Shen, R., & Akhtar, M. (2017). Bridging the gap between gut microbial dysbiosis and cardiovascular diseases. *Nutrients*, 9(8).

<https://doi.org/10.3390/nu9080859>

- Lee, C. J., Florea, L., Sears, C. L., Maruthur, N., Potter, J. J., Schweitzer, M., Magnuson, T., & Clark, J. M. (2019). Changes in Gut Microbiome after Bariatric Surgery Versus Medical Weight Loss in a Pilot Randomized Trial. *Obesity Surgery*, *29*(10), 3239–3245.  
<https://doi.org/10.1007/s11695-019-03976-4>
- Lehrke, M., & Marx, N. (2017). Diabetes Mellitus and Heart Failure. *American Journal of Medicine*, *130*(6), S40–S50. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.04.010>
- Liu, Y., Wang, Y., Ni, Y., Cheung, C. K. Y., Lam, K. S. L., Wang, Y., Xia, Z., Ye, D., Guo, J., Tse, M. A., Panagiotou, G., & Xu, A. (2020). Gut Microbiome Fermentation Determines the Efficacy of Exercise for Diabetes Prevention. *Cell Metabolism*, *31*(1), 77-91.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.001>
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota*. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Malta, D. C., Duncan, B. B., Schmidt, M. I., Machado, Í. E., da Silva, A. G., Bernal, R. T. I., Pereira, C. A., Damacena, G. N., Stopa, S. R., Rosenfeld, L. G., & Szwarcwald, C. L. (2019). Prevalence of diabetes mellitus as determined by glycated hemoglobin in the Brazilian adult population, national health survey. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *22*(Ted 66).  
<https://doi.org/10.1590/1980-549720190006.supl.2>
- Marlatt, K. L., White, U. A., Beyl, R. A., Peterson, C. M., Martin, C. K., Marco, M. L., Keenan, M. J., Martin, R. J., Aryana, K. J., & Ravussin, E. (2018). Role of resistant starch on diabetes risk factors in people with prediabetes: Design, conduct, and baseline results of the STARCH trial. *Contemporary Clinical Trials*, *65*(December 2017), 99–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.cct.2017.12.005>
- Mohajeri, M. H., Brummer, R. J. M., Rastall, R. A., Weersma, R. K., Harmsen, H. J. M., Faas, M., & Eggersdorfer, M. (2018). The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European Journal of Nutrition*, *57*(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4>
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., & Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and Healthy Aging*, *4*(4), 267–285. <https://doi.org/10.3233/NHA-170030>
- Napolitano, A., Miller, S., Nicholls, A. W., Baker, D., Van Horn, S., Thomas, E., Rajpal, D., Spivak, A.,

- Brown, J. R., & Nunez, D. J. (2014). Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS ONE*, *9*(7), 1–14.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100778>
- Palleja, A., Kashani, A., Allin, K. H., Nielsen, T., Zhang, C., Li, Y., Brach, T., Liang, S., Feng, Q., Jørgensen, N. B., Bojsen-Møller, K. N., Dirksen, C., Burgdorf, K. S., Holst, J. J., Madsbad, S., Wang, J., Pedersen, O., Hansen, T., & Arumugam, M. (2016). Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome Medicine*, *8*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0312-1>
- Parolini, C. (2019). *Effects of Fish n-3 PUFAs on Intestinal Microbiota and Immune System*.
- Pedersen, C., Gallagher, E., Horton, F., Ellis, R. J., Ijaz, U. Z., Wu, H., Jaiyeola, E., Diribe, O., Duparc, T., Cani, P. D., Gibson, G. R., Hinton, P., Wright, J., La Ragione, R., & Robertson, M. D. (2016). Host-microbiome interactions in human type 2 diabetes following prebiotic fibre (galacto-oligosaccharide) intake. *British Journal of Nutrition*, *116*(11), 1869–1877.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114516004086>
- Pisanu, S., Palmas, V., Madau, V., Casula, E., Deledda, A., Cusano, R., Uva, P., Vascellari, S., Boi, F., Loviselli, A., Manzin, A., & Velluzzi, F. (2020). Impact of a moderately hypocaloric mediterranean diet on the gut microbiota composition of italian obese patients. *Nutrients*, *12*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu12092707>
- Ruan, W., Engevik, M. A., Spinler, J. K., & Versalovic, J. (2020). Healthy Human Gastrointestinal Microbiome : Composition and Function After a Decade of Exploration. *Digestive Diseases and Sciences*, *65*(3), 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06118-4>
- Salazar, N., González, S., Nogacka, A. M., Rios-covián, D., Arboleya, S., & Reyes-gavilán, C. G. D. L. (2020). *Microbiome : Effects of Ageing and Diet*. *36*, 33–62.
- Sasaki, M., Ogasawara, N., Funaki, Y., Mizuno, M., Iida, A., Goto, C., Koikeda, S., Kasugai, K., & Joh, T. (2013). Transglucosidase improves the gut microbiota profile of type 2 diabetes mellitus patients: A randomized double-blind, placebo-controlled study. *BMC Gastroenterology*, *13*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-13-81>
- Sato, J., Kanazawa, A., Azuma, K., Ikeda, F., Goto, H., Komiya, K., Kanno, R., Tamura, Y., Asahara, T., Takahashi, T., Nomoto, K., Yamashiro, Y., & Watada, H. (2017). Probiotic reduces bacterial translocation in type 2 diabetes mellitus: A randomised controlled study. *Scientific Reports*,

7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12535-9>

- Schloss, J. A., Gibbs, R. A., Makhijani, V. B., & Marziali, A. (2020). Cultivating DNA Sequencing Technology after the Human Genome Project. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 21, 117–138. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-111919-082433>
- Serena, C., Ceperuelo-Mallafré, V., Keiran, N., Queipo-Ortuño, M. I., Bernal, R., Gomez-Huelgas, R., Urpi-Sarda, M., Sabater, M., Pérez-Brocal, V., Andrés-Lacueva, C., Moya, A., Tinahones, F. J., Fernández-Real, J. M., Vendrell, J., & Fernández-Veledo, S. (2018). Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME Journal*, 12(7), 1642–1657. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0068-2>
- Shanahan, F., Sinderen, D. Van, Toole, P. W. O., & Stanton, C. (2017). *Feeding the microbiota : transducer of nutrient signals for the host*. 1709–1717. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313872>
- Sharpton, T. J. (2014). *An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data*. 5(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>
- Simon, M. C., Strassburger, K., Nowotny, B., Kolb, H., Nowotny, P., Burkart, V., Zivehe, F., Hwang, J. H., Stehle, P., Pacini, G., Hartmann, B., Holst, J. J., Mackenzie, C., Bindels, L. B., Martinez, I., Walter, J., Henrich, B., Schloot, N. C., & Roden, M. (2015). Intake of lactobacillus reuteri improves incretin and insulin secretion in Glucose-Tolerant humans: A proof of concept. *Diabetes Care*, 38(10), 1827–1834. <https://doi.org/10.2337/dc14-2690>
- Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Bhutani, T., & Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>
- Soare, A., Khazrai, Y. M., Del Toro, R., Roncella, E., Fontana, L., Fallucca, S., Angeletti, S., Formisano, V., Capata, F., Ruiz, V., Porrata, C., Skrami, E., Gesuita, R., Manfrini, S., Fallucca, F., Pianesi, M., & Pozzilli, P. (2014). The effect of the macrobiotic Ma-Pi 2 diet vs. The recommended diet in the management of type 2 diabetes: The randomized controlled MADIAB trial. *Nutrition and Metabolism*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-39>
- Staley, C., Weingarden, A. R., Khoruts, A., & Sadowsky, M. J. (2017). Interaction of gut microbiota



- with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8006-6>
- Tang, W. H. W., Bäckhed, F., Landmesser, U., & Hazen, S. L. (2019). Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(16), 2089–2105. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.03.024>
- Tang, W. H. W., & Hazen, S. L. (2017). Microbiome, trimethylamine N-oxide, and cardiometabolic disease. *Translational Research*, 179, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.07.007>
- Vulevic, J., Juric, A., Tzortzis, G., & Gibson, G. R. (2013). A mixture of trans-galactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults<sup>1-3</sup>. *Journal of Nutrition*, 143(3), 324–331. <https://doi.org/10.3945/jn.112.166132>
- Weersma, R. K., Zhernakova, A., & Fu, J. (2020). *Interaction between drugs and the gut microbiome*. 1510–1519. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320204>
- WHO. (2020). Health at a glance. In *Tuberculosis* (Vol. 6011, Issue 24312).
- Wilkins, E., Wilson, L., Wickramasinghe, K., Bhatnagar, P., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Burns, R., Rayner, M., & Townsend, N. (2017). European Cardiovascular Disease Statistics 2017, European Heart Network, Brussels. *European Cardiovascular Disease Statistics*, 34(39), 3028–3034.
- Winston, J. A., & Theriot, C. M. (2020). Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota. *Gut Microbes*, 11(2), 158–171. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1674124>
- Yan, Q., Gu, Y., Li, X., Yang, W., Jia, L., Chen, C., Han, X., Huang, Y., Zhao, L., Li, P., Fang, Z., Zhou, J., Guan, X., Ding, Y., Wang, S., Khan, M., Xin, Y., Li, S., & Ma, Y. (2017). Alterations of the gut microbiome in hypertension. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00381>
- Zeisel, S. H., & Warrier, M. (2017). *Trimethylamine N -Oxide , the Microbiome , and Heart and Kidney Disease*.
- Zhang, Y., Gu, Y., Ren, H., Wang, S., Zhong, H., Zhao, X., Ma, J., Gu, X., Xue, Y., Huang, S., Yang, J., Chen, L., Chen, G., Qu, S., Liang, J., Qin, L., Huang, Q., Peng, Y., Li, Q., ... Wang, W. (2020). Gut microbiome-related effects of berberine and probiotics on type 2 diabetes (the PREMOTE

study). *Nature Communications*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18414-8>