

As implicações da Microbiota Intestinal na Diabetes Mellitus tipo 1

Ana Miguel Fonseca Machado

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos

junho de 2024

Declaração de Integridade

Eu, Ana Miguel Fonseca Machado, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição 41990 de Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 07/06/2024

Assinatura,



(assinatura conforme Cartão de Cidadão)

Agradecimentos

Aos meus pais e ao meu irmão, por me apoiarem sempre em todas as etapas da minha vida, por se mostrarem sempre disponíveis para me ajudar, por puxarem sempre por mim para me tornar uma pessoa cada vez melhor e por estarem sempre prontos para me amparar e transmitir novos ensinamentos.

Ao meu namorado, pelo apoio e paciência incansáveis, pelas palavras nos momentos mais difíceis, por me estenderes sempre a mão e nunca me deixares cair.

Às minhas amigas, por tornarem a Covilhã a minha segunda casa e por estarem em todos os momentos, quer nos bons quer nos maus. Sem vocês esta caminhada incrível seria praticamente impossível.

Ao meu orientador, Professor Doutor Manuel Lemos, por orientar esta dissertação, pela ajuda, disponibilidade e aprendizagem transmitida ao longo de todo o processo.

Um agradecimento final a todas as pessoas que se cruzaram na minha vida e que de alguma forma me ajudaram a ser a pessoa que sou hoje.

Resumo

Introdução: A microbiota intestinal representa todos os microrganismos que habitam o trato gastrointestinal, sendo a sua composição e equilíbrio condições necessárias para o desenvolvimento e manutenção da saúde, uma vez que esta desempenha várias funções essenciais na proteção e regulação metabólica e imunitária. A disbiose, caracterizada por um desequilíbrio na normal microbiota intestinal, parece estar envolvida no desenvolvimento de várias patologias, tanto intestinais, metabólicas como autoimunes. Uma dessas doenças é a Diabetes Mellitus tipo 1, que se caracteriza por uma destruição das células produtoras de insulina no pâncreas, levando a uma deficiência absoluta de insulina. O objetivo deste trabalho foi perceber se alterações na microbiota intestinal poderiam estar implicadas no desenvolvimento da Diabetes Mellitus tipo 1.

Métodos: Foi realizada uma pesquisa bibliográfica no motor de busca PubMed, de forma a identificar os artigos que comparassem a microbiota intestinal de indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 1 com a de indivíduos saudáveis, tendo utilizado as seguintes palavras-chave: "fecal microbiota", "fecal microbiome", "gut microbiota", "gut microbiome", "type 1 diabetes", "case-control study" e "observational study". Foram, também, consultadas as listas de referências bibliográficas dos artigos inicialmente identificados.

Resultados: Foram selecionados 15 artigos. A maioria dos artigos revelou alterações significativas na microbiota intestinal de indivíduos diabéticos, comparativamente à de indivíduos saudáveis, tendo relatado uma diminuição na diversidade da microbiota, com a diminuição de algumas espécies benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillales*. Para além disso, a maioria dos estudos relata um aumento significativo do filo *Bacteroidetes* nos diabéticos, mais concretamente o género *Bacteroides*. Ainda assim, os estudos apresentaram alguns resultados discordantes.

Conclusão: A maioria dos estudos relataram uma diminuição da diversidade da microbiota intestinal associada a uma redução de bactérias consideradas benéficas, que estariam envolvidas na permeabilidade intestinal, inflamação e regulação da imunidade, nos indivíduos diabéticos. Porém, os estudos apresentam algumas limitações, pelo que fica por esclarecer se essas alterações são causa da Diabetes Mellitus tipo 1 ou consequência desta. Para entender melhor a associação, são necessários estudos mais homogêneos e abrangentes.

Palavras-chave

Endocrinologia; Diabetes Mellitus; Diabetes Mellitus tipo 1; Microbiota; Microbioma; Microbiota fecal; Microbiota intestinal

Abstract

Introduction: The gut microbiota represents all microorganisms that inhabit the gastrointestinal tract, and its composition and balance are necessary conditions for development and maintenance of health, as it performs several essential functions in metabolic and immune regulation and protection. Dysbiosis is characterized by an imbalance in normal gut microbiota and appears to be involved in the development of several diseases, including intestinal, metabolic and autoimmune. One of these important diseases is type 1 Diabetes Mellitus, which is characterized by a destruction of insulin-producing cells in the pancreas, leading to an absolute insulin deficiency. The aim of this work was to understand whether changes in the gut microbiota could be implicated in the development of type 1 Diabetes Mellitus.

Methods: A bibliographic search was performed in the PubMed search engine to identify articles that compared the gut microbiota of individuals with type 1 Diabetes Mellitus with that of healthy individuals, using the following keywords: "fecal microbiota", "fecal microbiome", "gut microbiota", "gut microbiome", "type 1 diabetes", "case-control study" and "observational study". The lists of references of the initially identified articles were also consulted.

Results: 15 articles were selected. Most articles revealed significant changes in gut microbiota of diabetic individuals compared to that of healthy individuals, reporting a decrease in microbiota diversity, with a decrease in some beneficial species, such as Bifidobacterium and Lactobacillales. Furthermore, most studies report a significant increase in the phylum Bacteroidetes in diabetics, specifically the genus Bacteroides. Nonetheless, the studies presented some conflicting results.

Conclusion: Most studies reported a decrease in the diversity of gut microbiota associated with a reduction of bacteria considered beneficial, which would be involved in intestinal permeability, inflammation and immunity regulation, in diabetic individuals. However, due to some limitations of the studies, it remains unclear whether these changes are a cause of type 1 Diabetes Mellitus or a consequence of it, which is why more homogeneous and comprehensive studies are needed to better understand the association.

Keywords

Endocrinology; Diabetes Mellitus; Type 1 Diabetes Mellitus; Microbiota; Microbiome; Fecal Microbiota; Gut Microbiota

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Acrónimos	xvii
1. Introdução	1
1.1 Diabetes Mellitus	1
1.2 Microbiota Intestinal	3
1.3 Objetivos da Dissertação	8
2. Materiais e Métodos	9
3. Resultados	11
3.1 Murri M et al., 2013	11
3.2 Mejía-León ME et al., 2014	12
3.3 Soyucen E et al., 2014	13
3.4 de Goffau MC et al., 2014	13
3.5 Qi CJ et al., 2016	14
3.6 Stewart CJ et al., 2016	15
3.7 de Groot PF et al., 2017	15
3.8 Pellegrini S et al., 2017	16
3.9 Cinek O et al., 2018	16
3.10 Higuchi BS et al., 2018	17
3.11 Huang Y et al., 2018	18
3.12 Leiva-Gea I et al., 2018	18
3.13 Vatanen T et al., 2018	19
3.14 Traversi D et al., 2020	20
3.15 Petrak F et al., 2022	20
4. Discussão	27
5. Conclusão	31
Referências Bibliográficas	33

Lista de Figuras

Figura 1: Composição da microbiota intestinal

8

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação da microbiota do grupo de estudo (DM1) com o grupo controle	23
--	----

Lista de Acrónimos

AGCC	Ácidos Gordos de Cadeia Curta
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
HLA	Human Leukocyte Antigen
IDF	International Diabetes Federation
IMC	Índice de Massa Corporal
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
miRNAs	microRNAs
MODY	Maturity-onset Diabetes of the Young
PTGO	Prova de Tolerância à Glicose Oral
TEDDY	The Environmental Determinants of Diabetes in the Young
TGI	Trato Gastrointestinal

1. Introdução

1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) refere-se a um conjunto de distúrbios metabólicos, em que a principal característica é a hiperglicemia crônica (níveis de glicose persistentemente elevados no sangue), que se pode dever tanto a um déficit de secreção/produção de insulina como a uma resistência à sua ação ou, até mesmo, a ambos, como ocorre geralmente (1,2). A sua prevalência tem vindo a aumentar, visto que aumenta com a idade e se está a assistir a um envelhecimento progressivo da população e pode afetar indivíduos de ambos os sexos e todas as idades, em todo o mundo, sendo atualmente uma das causas mais prevalentes de morbimortalidade global (2,3).

O seu diagnóstico pode ser estabelecido tendo por base uma série de critérios, tais como: glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL; glicemia às 2h ≥ 200 mg/dL, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose; glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL acompanhada de sintomas clássicos de hiperglicemia ou de descompensação (poliúria/polidipsia/polifagia); ou hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$ (3,4). Assim, o diagnóstico requer dois resultados anormais, na mesma amostra ou em duas amostras diferentes, com exceção da glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL acompanhada de sintomas clássicos de hiperglicemia (4).

A Diabetes pode ser classificada em várias categorias, entre as quais, a DM tipo 1 e tipo 2, sendo estas as mais comuns, mas também a DM gestacional, diabetes monogénica (por exemplo, Maturity-onset diabetes of the young (MODY)), Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA), entre outros (4,5).

A DM1, anteriormente referida como diabetes insulínica dependente, juvenil ou de início na infância, constitui 5 a 10% dos casos e é resultado da destruição autoimune das células β pancreáticas (células produtoras de insulina no pâncreas), havendo envolvimento da imunidade humoral e celular, com a presença de vários autoanticorpos, levando a uma deficiência absoluta de insulina. Esta é a forma mais comum em crianças e adolescentes, mas pode ocorrer em qualquer idade, sendo as suas causas ainda desconhecidas, pensando-se ser resultado de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. A DM2, conhecida anteriormente como diabetes não insulínica dependente ou de início na idade adulta, é responsável por 90 a 95% dos casos e resulta de um déficit relativo de insulina, havendo perda progressiva da adequada secreção de insulina pelas células β pancreáticas, associado a uma resistência

periférica à sua ação. Esta está muitas vezes associada ao excesso de peso ou à obesidade, que, por si só, pode causar resistência à insulina, sendo um importante fator de risco. Além da obesidade, o risco também aumenta com a idade, inatividade física, história familiar de diabetes, história de diabetes gestacional e presença de dislipidemia e hipertensão arterial. Este tipo de diabetes, geralmente, não é diagnosticado durante anos, pois desenvolve-se de forma gradual e, muitas vezes, os doentes não se apercebem dos sintomas clássicos da hiperglicemia, sendo diagnosticada acidentalmente ou por complicações (3,4,6).

Nos últimos anos, a diabetes emergiu como uma das doenças crónicas mais prevalentes e de crescimento mais rápido no mundo, tendo a sua prevalência global atingido proporções pandémicas, segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF). Esta estimou a prevalência mundial de diabetes, em 2021, em 536,6 milhões (10,5%), na faixa etária dos 20 aos 79 anos, prevendo um aumento para 643 milhões (11,3%) em 2030 e para 783,2 milhões (12,2%) de pessoas, em 2045, sendo este aumento da prevalência atribuído, maioritariamente, ao envelhecimento da população e ao aumento da prevalência dos fatores de risco, sobretudo da obesidade. Em relação ao número de mortes estimou-se que, em 2021, a diabetes provocou 6,7 milhões de mortes. De referir, ainda, que a diabetes representa um encargo financeiro considerável aos serviços/sistemas de saúde, tendo sido responsável por 11,5% dos gastos em saúde, em 2021 (2,3,5,7). Ainda em termos mundiais, a IDF estimou que, em 2021, cerca de 239,7 milhões (44,7%) de pessoas com diabetes não tinham noção de que tinham DM e que 1 em cada 2 não está diagnosticada, sendo de extrema importância a deteção precoce de diabetes, na sua fase assintomática, para que se inicie o tratamento o mais precoce possível, de forma a prevenir ou retardar a ocorrência de complicações macro e/ou microvasculares e reduzindo a morbimortalidade associada à diabetes (3,8). Relativamente ao panorama nacional, o Observatório Nacional da Diabetes, estimou a prevalência da diabetes na população portuguesa, em 2021, em 1,1 milhões (14,1%), na faixa etária dos 20 aos 79 anos. De referir ainda que, em 2020, a diabetes foi responsável por 3,3% das mortes, assumindo um papel ainda algo significativo nas causas de morte (3).

A diabetes, principalmente quando não é bem controlada, associa-se a um elevado risco de complicações, micro e/ou macrovasculares, que se podem desenvolver em todas as formas de diabetes, apesar das taxas de progressão poderem ser diferentes, contribuindo para a morbimortalidade, custos em saúde e baixa qualidade de vida (4,6). Embora essas complicações possam afetar diversos órgãos, geralmente, os mais afetados são os rins, olhos, nervos periféricos e sistema vascular. Assim, as

complicações microvasculares incluem a neuropatia, nefropatia e retinopatia diabéticas. Esta última é a complicação mais comum, com uma prevalência global de 35% em diabéticos, e pode levar a hemorragias, descolamento da retina e cegueira. A nefropatia diabética caracteriza-se por uma diminuição progressiva na função renal e que pode coexistir com albuminúria, ocorrendo em aproximadamente 30% dos diabéticos. A neuropatia diabética é uma das principais causas de lesão nervosa, afetando especialmente os nervos periféricos mais longos responsáveis pela inervação dos membros inferiores, e pode ser dividida em vários subtipos, sendo a forma mais comum, a polineuropatia simétrica distal. Já as complicações macrovasculares englobam a doença vascular cerebral, doença coronária e doença vascular periférica, sendo que os diabéticos apresentam um risco duas a dez vezes superior de desenvolver e de ter um evento cardiovascular, relativamente aos indivíduos saudáveis (3,5). Assim, a diabetes, em muitos dos países desenvolvidos, representa uma das principais causas de cegueira, insuficiência renal e amputação dos membros inferiores (3).

O diagnóstico precoce juntamente com o tratamento precoce e um bom controlo glicémico, que é a base essencial na prevenção das complicações da diabetes, vai permitir prevenir e retardar o desenvolvimento e a progressão das complicações micro e/ou macrovasculares (8). Assim, o tratamento assenta, principalmente, em medidas não farmacológicas, com controlo dos fatores de risco preveníveis e educação do doente diabético, apelando a uma alimentação saudável e equilibrada e à prática de exercício físico regular, que promovem a perda de peso e uma melhoria da sensibilidade à insulina, e também a uma autovigilância e autocontrolo da diabetes, através de medições da glicemia. No entanto, quando não é possível obter um bom controlo glicémico apenas com medidas não farmacológicas, é necessário recorrer a medidas farmacológicas, com o uso de fármacos hipoglicemiantes orais, insulina e outros fármacos para controlo de fatores de risco, como hipertensão arterial ou dislipidemia (3,6).

1.2 Microbiota Intestinal

O termo microbiota refere-se ao conjunto de microrganismos que habitam em simbiose com o seu hospedeiro humano e que podem ser encontrados em vários locais do corpo humano como pele, vias aéreas superiores, tratos genitais e trato gastrointestinal (TGI), sendo diferente entre órgãos e até mesmo entre diferentes

regiões do próprio TGI (9,10,11). O TGI representa o maior compartimento do corpo humano, sendo a interface mais extensa entre o ambiente interno do corpo e o ambiente externo, e aquele onde é atingido a maior densidade e formação de uma comunidade microbiana albergando cerca de 10^{13} – 10^{14} microrganismos, que incluem, principalmente bactérias, sendo estas as mais estudadas, mas também vírus, fungos e outros tipos de parasitas, sendo globalmente denominado de Microbiota Intestinal (9,10,12,13). O número de microrganismos aumenta do TGI proximal para o distal e da camada epitelial para o lúmen, sendo essa diferença devido à existência de um ambiente mais agressivo no intestino proximal pela presença do ácido gástrico, da ação das enzimas digestivas, do movimento rápido do quimo e da diminuição da pressão parcial de oxigênio no intestino distal, o que faz com que, no intestino delgado, predominem bactérias aeróbias e no TGI inferior predominem as anaeróbias (14). Assim, o estômago engloba cerca de 10^3 – 10^4 bactérias, o duodeno 10^5 – 10^6 , o íleo terminal 10^8 – 10^9 e o intestino grosso 10^{12} – 10^{14} bactérias por grama de tecido, sendo esta última a mais populosa e a mais diversificada (15).

A barreira intestinal é um conjunto de camadas que cooperam entre si para equilibrar a interação entre o meio interno, o intestino, e os fatores externos, sendo constituída pela microbiota intestinal, pelo epitélio, muco e sistema imunológico intestinal, e que permite a homeostasia intestinal, definida como o estado saudável e equilibrado do intestino (12,13). Assim, a existência de uma microbiota intestinal é uma condição necessária para que haja o normal funcionamento da barreira, sendo importante manter uma composição benéfica desta ao longo da vida (14,16). Posto isto, surge o conceito de Eubiose ou microbiota saudável, que se refere ao equilíbrio do ambiente microbiano intestinal e que apresenta efeitos benéficos para todo o corpo humano e para a saúde, sendo que as comunidades microbianas intestinais saudáveis, geralmente, são caracterizadas por uma elevada diversidade de unidades taxonômicas, uma alta riqueza genética microbiana e um núcleo funcional e estável (13). Contrariamente, surge o conceito de Disbiose, que se refere a um desequilíbrio da microbiota intestinal seja pela perda de organismos benéficos, aumento de organismos potencialmente prejudiciais e/ou redução da diversidade microbiana (9). Esta está envolvida no desenvolvimento de várias doenças intestinais, autoimunes, metabólicas, neurológicas, entre outras, como por exemplo, as doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerosa), doença celíaca, asma, DM1, tendo em conta que pode provocar alterações na maturação do sistema imunológico e aumentar a permeabilidade e inflamação intestinais (9,11,17).

Atualmente, a microbiota intestinal pode ser considerada um órgão externo do corpo humano, visto que fornece importantes mecanismos de regulação metabólica e proteção, em conjunto com todos os sistemas de órgãos que compõem o corpo humano, essenciais para a manutenção da saúde (14,17). As suas principais funções são: digestão de polissacarídeos vegetais, isto é, digestão da fibra da dieta, que ocorre no intestino grosso; participação no metabolismo dos lípidos, proteínas e ácidos gordos; síntese de vitaminas e de coenzimas; fonte de energia para as células epiteliais intestinais e a regulação da sua atividade proliferativa; modulação das funções das células caliciformes e da secreção de muco; estimulação da imunidade local e sistêmica através da síntese de IgA, interferões e ativação de macrófagos e linfócitos; síntese de péptidos antibacterianos e de bacteriocinas e ativação da fagocitose, levando à inibição do crescimento de patógenos; regulação do peristaltismo intestinal; influência no metabolismo ósseo, na patogénese da osteoporose, na síntese de neurotransmissores e na eficácia de vários fármacos, principalmente antibióticos, inibidores da bomba de prótons, metformina, vitamina D e laxantes (14).

No intestino humano adulto foram identificados milhares de espécies bacterianas, mas a maioria pertence, essencialmente, a quatro filos dominantes: Bacteroidetes e Firmicutes são os mais predominantes, representado cerca de 90%, seguidos por Actinobacteria e Proteobacteria (9,17). Os Firmicutes são bactérias Gram-positivas, presentes, principalmente, na camada de muco e representam cerca de 60 a 80% das bactérias do intestino, sendo que as suas principais espécies são *Clostridium*, *Blautia*, *Lactobacillus*, *Fecalibacterium*, *Eubacterium*, *Roseburium*, *Ruminococcus* e *Streptococcus* e muitas delas se encontram associadas à produção de butirato e outros ácidos gordos de cadeia curta (AGCC). Já os Bacteroidetes são bactérias anaeróbias Gram-negativas, encontradas, essencialmente, no lúmen intestinal, representam cerca de 20 a 40% das bactérias do intestino e as suas principais espécies são *Bacteroides*, como por exemplo, *B. dorei*, *B. fragilis* e *B. thetaiotaomicron*, e *Prevotella*, que estão muito associadas à produção de propionato e acetato (12,13,17,18). De referir, que a proporção Firmicutes/Bacteroidetes foi referido com um indicador do grau de maturação da microbiota intestinal, visto que esta se encontra reduzida em lactentes e idosos, comparativamente com adultos (12).

Relativamente aos outros filos, os Actinobacteria têm como género predominante o *Bifidobacteria*, que representa cerca de 5% da microbiota do adulto, mas mais de 90% das crianças com idade inferior a 2 anos, e é capaz de digerir fibra, produzindo butirato, havendo, ainda, outros géneros como *Atopobium* e *Collinsella*. As Proteobacteria, representa menos de 1% da microbiota e é representada,

essencialmente, pela família Enterobacteriaceae, que engloba, particularmente, o gênero *Escherichia*, com um maior destaque para a *E. coli*. Por último, o Verrucomicrobiota é representado apenas por uma única espécie, *Akkermansia muciniphila*, que representa cerca de 0,5 a 5% da população bacteriana no intestino e degrada a mucina em acetato, enquanto o Bacillota engloba anaeróbios, onde se inclui o gênero *Blautia* genus (17,18).

Na constituição da microbiota intestinal, como referido anteriormente, não há apenas bactérias, havendo, por isso, membros de outros reinos, como do reino Archaea (procariontes unicelulares), particularmente espécies de *Methanobrevibacter*, responsáveis pela produção de metano, e do reino Eukarya (eucariontes), como a levedura *Candida*. Também vírus e parasitas microbianos fazem parte da microbiota intestinal, tendo todos eles um papel significativo na manutenção de um intestino saudável e equilibrado (17).

Apesar da composição da microbiota intestinal ser variável e sofrer variações e alterações, foram identificados três tipos de microbiota intestinal considerada estável, denominados enterótipos, que são independentes da idade, sexo, índice de massa corporal (IMC) ou localização geográfica, tendo por base a composição de espécies da microbiota, em associação à alimentação a longo prazo. Assim, uma dieta rica em proteínas e gordura animal associa-se a um predomínio de *Bacteroides*, representando o enterótipo 1, enquanto uma dieta rica em hidratos de carbono tem um predomínio de *Prevotella* e representa o enterótipo 2. Por fim, o enterótipo 3 engloba, predominantemente, os gêneros *Ruminococcus* e *Akkermansia* (10,15).

A microbiota está em constante desenvolvimento, sendo que se desenvolve desde o nascimento até ao fim da vida, tendo em conta que a composição da microbiota de um bebé, de uma criança, de um adolescente, de um adulto e de uma pessoa idosa é sempre diferente. Atualmente, ainda não está esclarecido se o útero é colonizado por microrganismos ou se é estéril, havendo estudos que defendem, por isso, que o desenvolvimento da microbiota intestinal começa no útero e outros que defendem que esta só se começa a desenvolver quando o bebé atravessa o canal de parto e que depende do tipo de parto. Assim, a colonização da microbiota de um bebé começa com uma microbiota da mãe diversificada e, posteriormente, há influências ambientais sobre esta, sendo esta colonização muito dinâmica nas primeiras semanas de vida e onde apresenta maior plasticidade. Por volta dos seis meses, é quando a microbiota começa a ser mais influenciada pela nutrição, visto corresponder à altura em que normalmente se inicia a diversificação alimentar. Atingindo um ano de idade, a

microbiota parece já desempenhar as principais funções que uma microbiota do adulto, embora continue no seu processo de colonização e mudança, havendo uma estabilização apenas por volta dos dois/três anos de idade, passando a assemelhar-se à microbiota intestinal de um adulto (9,16,17).

Na vida adulta, a microbiota intestinal é relativamente estável, ao contrário da primeira infância, altura em que esta se encontra em processo de colonização e maturação e, por isso, mais vulnerável, sendo facilmente perturbada por inúmeros fatores, de entre os quais se destacam a idade gestacional, o tipo de parto, a exposição aos antibióticos, a alimentação, o ambiente e o estado fisiológico da mãe. Assim, sabe-se que a microbiota intestinal de bebés que nasceram por via vaginal é semelhante à microbiota vaginal das mães e que a dos bebés nascidos por cesariana é semelhante à microbiota da pele e do ambiente, sendo que esta diferença na composição da microbiota do bebé se mantém, geralmente, até 28 dias após o nascimento, podendo mesmo durar até um a dois anos após (16,19). Relativamente aos antibióticos, aqueles mais usados na primeira infância são os de amplo espectro, como, por exemplo, os beta-lactâmicos, macrólidos e cefalosporinas, sendo a sua exposição, tanto através das mães durante a gravidez como do pós-parto e lactação, prevalente, afetando profundamente a microbiota intestinal. Também se sabe que hospitalização prolongada numa Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais está associada a alterações na microbiota, principalmente de bebés prematuros. Em termos de alimentação, demonstrou-se que a amamentação materna, as fórmulas de leite ou a combinação destas afetam de forma diferente a maturação da microbiota intestinal e o próprio sistema imunitário do bebé. Por último, a dieta da mãe durante a gravidez, assim como a obesidade materna, podem influenciar a microbiota (19). Embora a microbiota intestinal de um adulto seja relativamente estável, está sempre em constante interação com o ambiente e, por isso, sujeita a fatores externos/ambientais, que podem levar a mudanças significativas, tais como a alimentação, medicamentos, especialmente os antibióticos, localização geográfica, estilo de vida, higiene, urbanização, poluição, substâncias de abuso, entre outras (9,10,11,15).

Tendo em conta que a disbiose está envolvida no desenvolvimento de inúmeras doenças, manter uma microbiota intestinal saudável parece ser uma estratégia terapêutica com potencial para o tratamento destas. Assim, para resolver essas questões e se alcançar os objetivos, pode-se recorrer a várias abordagens, tais como: alterações na dieta, recorrendo-se, sobretudo, a uma dieta mediterrânica, rica em vegetais, grãos, frutas e peixes, que propicia um ambiente favorável para as bactérias mais benéficas; uso de pré- e pró-bióticos; transplante da microbiota fecal, sem nunca

esquecer os seus efeitos adversos como diarreia, obstipação e, sobretudo, a transmissão de potenciais agentes patogénicos; uso de metabólitos, como por exemplo, os AGCC, que exibem efeitos anti-inflamatórios; os microRNAs (miRNAs), sintetizados, principalmente, nas células epiteliais intestinais, sendo que um défice na sua síntese foi associado a disbiose da microbiota intestinal; e, ainda, abordagens baseadas em nanomedicina (11,14).

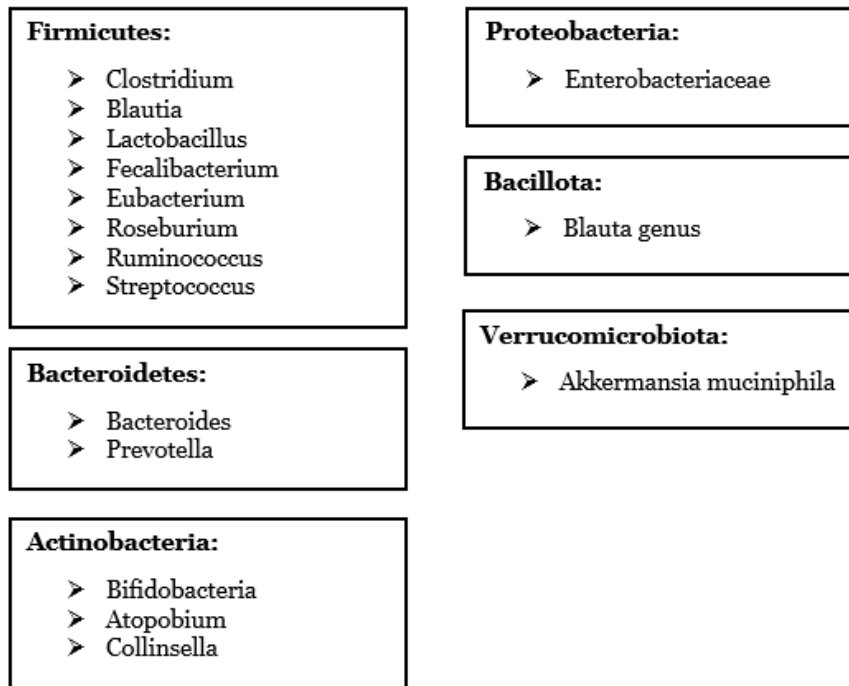


Figura 1: Composição da microbiota intestinal

1.3 Objetivo da Dissertação

O objetivo desta tese foi comparar, através de uma revisão da literatura, a composição da microbiota intestinal entre indivíduos com o diagnóstico de DM1 e indivíduos saudáveis, de forma a verificar se haveria diferenças entre eles e, havendo, se essas diferenças poderiam ter contribuído para o desenvolvimento da diabetes e para a sua progressão.

2. Materiais e Métodos

Para a elaboração desta dissertação foi realizada uma pesquisa bibliográfica no motor de busca PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), de forma a identificar os artigos científicos referentes ao tema, principalmente estudos de caso-controlo ou estudos observacionais, que comparassem a microbiota intestinal de indivíduos com DM1 com a de indivíduos saudáveis.

A estratégia de pesquisa usada foi, inicialmente, “(“fecal microbiota” OR “fecal microbiome” OR “gut microbiota” OR “gut microbiome”) AND “type 1 diabetes”, sendo depois acrescentada à estratégia de pesquisa “case-control study” e “observational study”. Foram incluídos apenas os artigos que tinham estudos realizados em humanos, já com o diagnóstico de DM1 e que tinham sido publicados nos últimos 10 anos, tendo sido excluídos aqueles que não se encontravam escritos em português ou inglês. Foi ainda realizada uma análise dos artigos, com base nos seus títulos e resumos, excluindo-se os estudos que não eram relevantes para o tema. Por último, e de forma a identificar artigos que possam não ter sido encontrados na estratégia de pesquisa inicial, foram consultadas as listas de referências bibliográficas dos artigos inicialmente selecionados.

3. Resultados

A tabela 1 representa a comparação da microbiota do grupo de estudo (DM1) com o grupo controlo, de modo a facilitar a interpretação dos resultados.

3.1 Murri M et al., 2013 (20)

Este estudo caso-controlo procurou quantificar e avaliar se há ou não diferenças na composição da microbiota intestinal de crianças com DM1, comparativamente a crianças saudáveis e, assim, verificar se há uma possível relação da microbiota intestinal com os níveis de glicose no sangue.

Este estudo incluiu um total de 32 crianças caucasianas, sendo que 16 tinham DM1, com idade média de $7,16 \pm 0,72$ anos, e as outras 16 eram saudáveis, com idade média de $7,48 \pm 0,87$ anos. Todas as crianças foram divididas em grupos consoante a idade, sexo, raça, modo de parto e duração da amamentação, de modo a homogeneizar os resultados pela exclusão da influência de fatores fisiológicos.

Com este estudo verificou-se que o número de bactérias Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes foi significativamente diferente entre os grupos, ao passo que as Proteobacteria e Fusobacteria foram semelhantes. Nas crianças com DM1, o número de bactérias do filo Actinobacteria e Firmicutes, bem como, a relação Firmicutes/Bacteroidetes foi significativamente menor, enquanto o número de Bacteroidetes aumentou significativamente, comparativamente às crianças saudáveis. Dentro do filo Firmicutes, nas crianças com DM1, a quantidade de Veillonella foi significativamente maior e a de Blautia coccoides-Eubacterium rectale foi significativamente menor, em comparação com as crianças saudáveis. Por outro lado, dentro do filo Bacteroidetes, nas crianças com DM1, a quantidade de Bacteroides foi significativamente maior, enquanto a de Prevotella foi significativamente menor, em comparação com as crianças saudáveis. Por fim, dentro do filo Actinobacteria, o número de Bifidobacterium foi significativamente menor nas crianças com DM1. Além de tudo isto, verificou-se que o número de Lactobacillus foi significativamente menor e os níveis de Clostridium significativamente maiores, nas crianças com DM1, comparativamente com as saudáveis.

Constatou-se que o número de Bifidobacterium e Lactobacillus, bem como a relação Firmicutes/Bacteroidetes correlacionam-se, significativamente, de forma

negativa com os níveis de glicose no sangue e os valores de HbA1c ($p < 0,05$; $p = 0,012$ e $p < 0,001$, respetivamente), ao contrário do número de Clostridium que se correlaciona de forma positiva ($p = 0,016$).

Posto isto, foi possível verificar que o número de bactérias produtoras de ácido láctico e de butirato, assim como as responsáveis pela degradação de mucina foi, significativamente, menor nas crianças diabéticas, comparativamente às saudáveis, sendo estas bactérias essenciais na manutenção da integridade intestinal.

3.2 Mejía-León ME et al., 2014 (21)

Mejía-León ME et al. conduziram um estudo com o objetivo de avaliar a composição da microbiota intestinal em crianças mexicanas com o diagnóstico de DM1, tanto no início como após o tratamento da doença por mais de 2 anos, comparativamente a indivíduos saudáveis.

O estudo envolveu 29 crianças, com idades entre os 7 e os 18 anos, tendo sido incluídas 8 crianças com DM1 recém-diagnosticadas, 13 crianças com Diabetes Mellitus tipo 1 após 2 anos de tratamento com insulina e com níveis de HbA1C $< 8\%$ e 8 crianças saudáveis, sendo que 4 dessas crianças eram irmãos de doentes com DM1. As crianças com DM1 foram recrutadas no Hospital Infantil do Estado de Sonora, no México. Foram recolhidas informações clínicas, como por exemplo, tipo de parto, tempo de amamentação, padrões de alimentação complementar no primeiro ano de vida e infeções, e, no momento do estudo, todas as crianças estavam sem usar antibióticos há pelo menos 3 meses. Foram também determinados haplótipos predisponentes, sendo que todos os casos de DM1 tinham pelo menos um alelo de risco do Antígeno Leucocitário Humano (HLA).

Relativamente aos resultados, estes mostraram que as crianças do grupo controlo tinham uma microbiota intestinal dominada por Prevotella, enquanto as crianças recém-diagnosticadas com DM1 apresentavam uma representação maior de Bacteroides ($p < 0,0037$), tendo proporções reduzidas de Prevotella ($p < 0,0003$), Megamonas ($p < 0,0161$) e Acidaminococcus ($p < 0,0214$) em comparação com os controlos. As crianças com DM1 tratadas durante pelo menos 2 anos com insulina apresentaram uma abundância intermédia de Bacteroides e Prevotella entre os controlos e os casos de DM1 recém-diagnosticados.

3.3 Soyucen E et al., 2014 (22)

Soyucen E et al. conduziram um estudo com o objetivo de investigar a relação entre a microbiota intestinal e a presença de DM1 em crianças turcas, para determinar se esta poderia explicar, em parte, a etiologia da doença.

O estudo envolveu 70 crianças, sendo o grupo de estudo composto por 35 pacientes (16 do sexo feminino e 19 do sexo masculino), com idade média de $10,73 \pm 4,16$ anos, que foram acompanhados pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de Istambul, e que tinham sido diagnosticados recentemente com DM1. Já o grupo de controlo é composto por 35 indivíduos saudáveis (15 do sexo feminino e 20 do sexo masculino), com idade média de $9,96 \pm 4,09$ anos, que foram selecionados aleatoriamente, mas com características demográficas semelhantes.

Relativamente aos resultados, estes mostraram que no grupo de crianças com DM1 houve uma colonização por Bifidobacterium menor, comparativamente ao grupo controlo ($p < 0,05$), enquanto a colonização por Enterobacteriaceae (exceto Echerichia coli) e por Candida albicans encontrava-se aumentada, em comparação com o grupo controlo ($p < 0,05$).

3.4 de Goffau MC et al., 2014 (23)

de Goffau MC et al. conduziram um estudo de forma a comparar a microbiota intestinal de crianças diagnosticadas recentemente com DM1 com a microbiota intestinal de crianças saudáveis.

Este estudo envolveu 28 crianças diabéticas, de diferentes países europeus (4 da França, 1 da Grécia, 3 da Estónia, 2 da Lituânia e 18 da Finlândia) e 27 crianças saudáveis. Todas as crianças tinham idades compreendidas entre o 1º ano de vida e os 5 anos. Para reportar os resultados as crianças foram divididas em duas faixas etárias: um grupo com crianças com menos de 2,9 anos e outro com mais de 2,9 anos.

Nas crianças com menos de 2,9 anos, os clusters Clostridium IV e XIVa e o Lactobacillus plantarum et rel. foram, significativamente, mais abundantes em crianças saudáveis, comparativamente às crianças diabéticas, ao contrário dos Bacteroidetes e do Streptococcus mitis et rel., que foram, significativamente, mais

abundantes nas crianças com DM1. Nas crianças com mais de 2,9 anos, verificou-se que as crianças saudáveis apresentavam um maior número de espécies produtoras de butirato nos clusters Clostridium IV e XIVa, em comparação com as crianças diabéticas da mesma idade e até mesmo do grupo etário mais jovem, sendo que a grande diferença entre as crianças saudáveis e as crianças diabéticas foi encontrada no cluster XIVa de Clostridium, uma vez que várias espécies não produtoras de butirato eram mais abundantes nas crianças diabéticas mais velhas. Assim, as crianças diabéticas da faixa etária mais velha apresentaram uma diversidade microbiana aumentada, tendo sido encontrado um ligeiro excesso de Clostridium stercorarium.

3.5 Qi CJ et al., 2016 (24)

Qi CJ et al. conduziram um estudo caso-controlo com o objetivo de avaliar a alteração da microbiota intestinal em crianças diagnosticadas recentemente com DM1, comparativamente com crianças saudáveis, de forma a determinar se a microbiota intestinal poderia explicar, em parte, a etiologia desta doença.

Este estudo envolveu um total de 30 crianças chinesas, sendo o grupo de estudo constituído por 15 crianças recentemente diagnosticadas com DM1 (há menos de 6 meses), com idade média de $11,4 \pm 3,0$ anos, recrutadas do Hospital da Faculdade de Medicina da União de Pequim. O grupo controlo foi composto por 15 crianças saudáveis, que apresentaram um resultado negativo para todos os autoanticorpos da DM1 e tinham características como idade, género, etnia, tipo de parto e duração do aleitamento materno, semelhantes às do grupo de estudo.

Em relação aos resultados, estes mostraram uma diminuição considerável da riqueza da microbiota intestinal nas crianças com DM1, em comparação com as crianças saudáveis ($p = 0,047$). Relativamente à sua composição, demonstrou-se um aumento de Blautia no grupo de estudo, comparativamente ao grupo controlo, havendo uma diminuição de Haemophilus, Lachnospira, Dialister e Acidaminococcus. Ainda se demonstrou que a percentagem de Blautia estava relacionada, de forma positiva, com a HbA1c, o número de autoanticorpos da DM1 e os títulos de autoanticorpos contra a tirosina fosfatase.

3.6 Stewart CJ et al., 2016 (25)

Stewart CJ et al. dirigiram um estudo observacional que visou comparar a microbiota intestinal de indivíduos com DM1, com bom controlo glicémico e altos níveis de capacidade física, com a de indivíduos saudáveis, sem diabetes.

Foram incluídos, no estudo, um total de 20 indivíduos adultos, 10 homens com DM1, diagnosticados há pelo menos 5 anos e com idades entre os 18 e os 35 anos (idade de 27 ± 2 anos), e 10 saudáveis, sem diabetes. Os dois grupos foram agrupados quanto à idade, género, capacidade física, IMC e hábitos de exercício físico.

Os resultados mostraram que *Faecalibacterium* sp., *Roseburia* sp. e *Bacteroides* sp. eram os mais abundantes na microbiota intestinal tanto dos pacientes com DM1 como dos indivíduos saudáveis. Os níveis de *Bacteroides* sp. eram mais altos no grupo controlo ($p = 0,06$) e os níveis de *Bifidobacterium* sp. eram superiores no grupo dos diabéticos tipo 1 ($p = 0,08$), mas estes resultados não se mostraram estatisticamente significativos. Assim, este estudo conclui que o perfil da microbiota intestinal dos adultos com DM1 com controlo glicémico apertado, é muito semelhante ao dos indivíduos saudáveis.

3.7 de Groot PF et al., 2017 (26)

de Groot PF et al. conduziram um estudo observacional com o objetivo de avaliar a composição da microbiota intestinal em pessoas com DM1 e perceber se há diferenças comparativamente a pessoas saudáveis.

O estudo envolveu um total de 103 pessoas, sendo o grupo de estudo composto por 53 pacientes com DM1 controlada e sem complicações, selecionados de seis centros médicos da região de Amesterdão, na Holanda, e o grupo controlo foi constituído por 50 pessoas saudáveis, que foram recrutadas por meio de anúncios, sendo que todos os participantes do estudo foram emparelhados de acordo com a idade, sexo e índice de massa corporal.

Os resultados mostraram que a microbiota intestinal era diferente entre o grupo de estudo e o grupo controlo. Na análise fecal, houve uma diminuição das espécies produtoras de butirato, mais concretamente de *Roseburia*, nos indivíduos com DM1, sendo que também os níveis plasmáticos de acetato e propionato eram mais baixos nestes indivíduos, comparativamente aos indivíduos saudáveis. Um género e uma

família apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo de estudo e o grupo controlo: Christensenella ($p = 0,015$) e Rhodospirillales ($p = 0,009$), tendo sido relacionados com o controlo glicémico, os parâmetros inflamatórios e os ácidos gordos de cadeia curta. Além disso, este estudo não estabeleceu correlação entre a microbiota e a HbA1c.

3.8 Pellegrini S et al., 2017 (27)

Pellegrini S et al. dirigiram um estudo com o intuito de avaliar o perfil inflamatório intestinal e a composição da microbiota intestinal em pacientes com DM1 em comparação com indivíduos saudáveis.

O estudo incluiu 54 participantes, que realizaram endoscopia gastroduodenal e biópsia duodenal, na Unidade de Gastroenterologia do Instituto Científico San Raffaele, em Milão, tendo sido selecionados 19 indivíduos com DM1 diagnosticada (alguns deles com complicações secundárias 7/19 retinopatia, 4/19 neuropatia, 3/19 gastroparesia), 19 indivíduos com doença celíaca diagnosticada no momento da biópsia e 16 indivíduos saudáveis (grupo controlo).

A análise imunohistoquímica revelou um status inflamatório específico dos casos de DM1 que se caracteriza por um aumento da infiltração da linhagem de monócitos/macrófagos, comparativamente ao grupo controlo e aos pacientes com doença celíaca ($p < 0,01$). Além disso, a composição da microbiota intestinal mostrou-se diferente, em comparação com o grupo de controlo, havendo um aumento de Firmicutes e da proporção Firmicutes/Bacteroidetes e uma redução de Proteobacteria e Bacteroidetes, sendo que o aumento de Firmicutes e a redução de Proteobacteria pareceu ser específico para o grupo composto por indivíduos com DM1. De referir que a expressão de genes específicos para a inflamação na DM1 estava associada à abundância de bactérias específicas no duodeno.

3.9 Cinek O et al., 2018 (28)

Cinek O et al. levaram a cabo um estudo com o objetivo de avaliar se há ou não associação da DM1 com a composição do bacterioma fecal, em 4 populações de países africanos e asiáticos, geograficamente distantes.

Foram colhidas amostras de 73 crianças e adolescentes (idades entre os 3 e os 19 anos) com o diagnóstico recente de DM1 (19 do Azerbaijão, 20 da Jordânia, 14 da

3.11 Huang Y et al., 2018 (30)

Huang Y et al. conduziram este estudo com o intuito de averiguar se a disbiose da microbiota intestinal está ou não associada à DM1 e se é possível correlacioná-la com a clínica.

O estudo envolveu um total de 22 indivíduos chineses, sendo que 12 tinham o diagnóstico de DM1, com uma HbA1c < 9,0%, e 10 eram saudáveis. Todos os indivíduos tinham idades entre os 12 e os 33 anos e não tomavam antibióticos há pelo menos 3 meses.

Em termos de resultados, constatou-se que o filo dominante nos pacientes com DM1 era o Bacteroidetes, enquanto nos indivíduos saudáveis era o Firmicutes, havendo um aumento do rácio Bacteroidetes/Firmicutes nos pacientes com DM1. As bactérias mais abundantes nos indivíduos com DM1 eram Porphyromonadaceae (uma família de Bacteroidetes) e nos saudáveis eram Ruminococcaceae, Veillonellaceae, Phascolarctobacterium e Paenibacillaceae (famílias de Firmicutes). Relativamente à associação entre a composição da microbiota intestinal e os dados clínicos, demonstrou-se que a abundância de uma família Ruminococcaceae e do seu género Faecalibacterium estava inversamente correlacionada com os níveis de HbA1c ($p = 0.017$). Por fim, analisou-se que o número de autoanticorpos anti-células dos ilhéus correlacionou-se positivamente com as abundâncias de Bacteroides ($p = 0.011$) e Bilophila ($p = 0.013$), mas inversamente com as abundâncias de Streptococcus ($p = 0.041$) e Ruminococcaceae ($p = 0.026$).

3.12 Leiva-Gea I et al., 2018 (31)

Leiva-Gea I et al., orientaram um estudo caso-controlo para avaliar a composição da microbiota intestinal em indivíduos com DM1 e compará-la com a de indivíduos saudáveis.

No estudo estiveram envolvidos um total de 43 crianças espanholas, com idade inferior a 18 anos, de origem caucasiana e da mesma região geográfica. Destas, 15 crianças apresentavam DM1, 15 tinham diabetes MODY (Maturity-onset Diabetes of the Young) tipo 2 e 13 eram crianças saudáveis.

Em comparação com os indivíduos saudáveis, os pacientes com DM1 apresentaram algumas alterações na microbiota intestinal, como um aumento significativo na

abundância de Bacteroidetes e diminuição significativa de Firmicutes e Actinobacteria, uma abundância significativamente menor de Proteobacteria e uma relação Firmicutes-Bacteroidetes significativamente menor. Dentro dos Bacteroidetes, três famílias foram significativamente mais abundantes: Bacteroidaceae, Rikenellaceae e Prevotellaceae; dos Firmicutes, três famílias foram significativamente mais abundantes: Ruminococcaceae, Veillonellaceae e Streptococcaceae; para as famílias de Proteobacteria, houve um aumento significativo de Enterobacteriaceae.

Relativamente aos géneros de Bacteroidetes, o *Bacteroides* apresentou uma abundância significativamente maior, o género *Prevotella* aumentou significativamente e os géneros de Firmicutes significativamente mais abundantes foram os seguintes: *Ruminococcus*, *Blautia*, *Veillonella* e *Streptococcus*. Quatro géneros foram significativamente menores *Lachnospira*, *Roseburia*, *Anaerostipes* e *Faecalibacterium*. Já os géneros de Proteobacteria, *Sutterella* e *Enterobacter* aumentaram significativamente.

Os indivíduos saudáveis, comparativamente aos indivíduos com DM1, apresentaram abundância significativamente maior de Lachnospiraceae e de Bifidobacteriaceae, da família de Actinobacteria, sendo que desta apenas o género *Bifidobacterium* aumentou significativamente.

Este estudo identificou ainda um aumento da permeabilidade intestinal nos doentes com DM1, para além de uma diversidade de microrganismos diminuída, o que pode estar relacionado com o processo autoimune decorrente da doença.

3.13 Vatanen T et al., 2018 (32)

Vatanen T et al. conduziram este estudo, como parte do projeto TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young), com o objetivo de investigar a composição e as características da microbiota intestinal em indivíduos com risco de desenvolver DM1 e em indivíduos diagnosticados com DM1 de início precoce.

Neste estudo avaliou-se 783 crianças, acompanhadas desde os 3 meses até aos 5 anos de idade e provenientes de 6 centros clínicos de 4 países diferentes (Finlândia, Alemanha, Suécia e Estados Unidos), que desenvolveram autoimunidade contra os ilhéus pancreáticos (n = 267) ou DM1 (n = 101), ou que foram selecionados como controlos (n=415).

Quando comparado o grupo de crianças com DM1 com o grupo de controlo, verificou-se que os controlos apresentaram níveis mais elevados das espécies *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*, enquanto os diabéticos mostraram níveis mais elevados das espécies *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Roseburia hominis* e *Alistipes shahii*.

3.14 Traversi D et al., 2020 (33)

Traversi D et al. realizaram um estudo caso-controlo com o objetivo de identificar possíveis fatores de risco ambientais, comportamentais e microbianos que estivessem associados ao diagnóstico da DM1, em crianças da região do Piemonte, em Itália.

O estudo incluiu um total de 106 crianças, sendo que 40 tinham DM1 e 56 eram crianças saudáveis.

Os resultados mostraram que a microbiota intestinal de todas as crianças era composta, essencialmente, por Firmicutes e Bacteroidetes, seguidos por Proteobacteria e Actinobacteria. Nas crianças com DM1, foi possível observar um aumento nos níveis de três membros de Bacteroidetes (*Alistipes senegalensis*, *Bacteroides timonensis* e *Barnesiella intestinihominis*) e de três membros de Firmicutes (*Christensenella timonensis*, *Ruminococcus bromii* e *Urmitella timonensis*). Além disso, as unidades taxonómicas mais abundantes foram Rikenellaceae, Prevotellaceae (*Prevotella copri*), Barnesiellaceae, Lachnospiraceae e Ruminococcaceae (*Ruminococcus bromii*), tendo sido significativamente mais abundantes nas crianças com DM1. Assim, um dos fatores de risco para o desenvolvimento de DM1 é a alteração da microbiota intestinal, no que toca a níveis aumentados de Firmicutes e níveis diminuídos de Bacteroidetes, sendo um fator protetor os níveis aumentados de *Bifidobacterium* spp.

3.15 Petrak F et al., 2022 (34)

Petrak F et al. realizaram um estudo caso-controlo com o objetivo de analisar a composição da microbiota intestinal e verificar se esta diferia entre indivíduos com DM1 com ou sem depressão, comparativamente a indivíduos saudáveis.

Foram incluídos um total de 60 adultos, com idades entre os 18 e os 65 anos, distribuídos por 3 grupos: grupo A composto por 20 adultos com DM1; grupo B com 20 adultos diagnosticados com DM1 e depressão; e grupo C com 20 adultos saudáveis. Os indivíduos com diabetes foram recrutados de clínicas de diabetes em Dortmund e

Bochum, na Alemanha. Já os indivíduos saudáveis foram recrutados de forma voluntária, através de contactos pessoais, informações online e avisos divulgados na Universidade de Bochum.

Este estudo demonstrou diferenças significativas a nível do filo Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria entre os grupos do estudo, sendo que os Firmicutes eram menos abundantes no grupo C em comparação com o grupo B ($p = 0,04$), ao contrário dos Bacteroidetes que eram mais abundantes no grupo C quando comparado com o grupo B ($p = 0,044$) e dos Actinobacteria que eram mais abundantes no grupo C, mas em comparação com o grupo A ($p = 0,024$).

A nível da família, verificou-se que o grupo C apresentava uma abundância maior de Lactobacillaceae e Leuconostocaceae quando comparado com os grupos A ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respetivamente) e B ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respetivamente). Já no grupo B verificou-se uma maior abundância de Veillonellaceae em comparação com o grupo A ($p < 0,001$) e C ($p \leq 0,01$). Em relação a Proteobacteria, foram observadas diferenças significativas em relação a Succinivibrionaceae e Rhodospirillaceae que se mostraram mais abundantes nos grupos A e B em comparação com o grupo C.

Por último, também a nível do género foram encontradas diferenças significativas, sendo que *Pediococcus* (família Lactobacillaceae) e *Weissella* (também Lactobacillaceae) foram mais abundantes no grupo C, enquanto o grupo *Prevotellaceae_NK3B31* foi menos abundante, quando comparado com os grupos A e B. Por sua vez, *Coprococcus* (família Lachnospiraceae), *Succinivibrio* e o grupo *Christensenellaceae R7* foram mais abundantes nos grupos A e B, em comparação com o grupo C. Também se observou que *Megasphaera* (família Veillonellaceae) era mais abundante no grupo B.

Assim resumindo, este estudo verificou que o grupo B (diabetes com depressão) apresentou uma abundância significativamente maior de *Megasphaera* em comparação com os grupos A e C, e que ambos os grupos de diabetes apresentaram uma maior abundância de *Christensenellaceae*, *Succinivibrionaceae* e *Rhodospirillaceae* em comparação com o grupo saudável, mas com abundâncias semelhantes entre os grupos.

Tabela 1: Comparação da microbiota do grupo de estudo (DM1) com o grupo controlo

Autor e ano de publicação	País	Tamanho da amostra	Firmicutes	Bacteroidetes	Actinobacteria	Proteobacteria	Bacillota
[20] Murri M et al., 2013		32 crianças (16 estudo vs 16 controlo)	Veillonella e Clostridium em maior número. Blautia coccoides-Eubacterium rectale e Lactobacillus em menor número	Bacteroides em maior número. Prevotella em menor número	Bifidobacterium em menor número	Semelhante	-
[21] Mejía-León ME et al., 2014	México	29 crianças (21 estudo vs 8 controlo)	Megamonas e Acidaminococcus em menor número	Bacteroides em maior número. Prevotella em menor número	-	-	-
[22] Soyucen E et al., 2014	Turquia	70 crianças (35 estudo vs 35 controlo)	-	-	Bifidobacterium em menor número	Enterobacteriaceae (exceto Echerichia coli) em maior número	-
[23] de Goffau MC et al., 2014	França, Grécia, Estónia, Lituânia e Finlândia	55 crianças (28 estudo vs 27 controlo)	Antes dos 2,9 anos: Clusters de Clostridium IV e XIVa e Lactobacillus em menor número. Streptococcus mitis em maior número. Nas crianças com mais de 2,9 anos: clusters de Clostridium não produtoras de butirato em maior número	Bacteroidetes em maior número	-	-	-

As implicações da Microbiota Intestinal na Diabetes Mellitus tipo 1

[24] Qi CJ et al., 2016	China	30 crianças (15 estudo vs 15 controlo)	Blautia em maior número. Acidaminococcus, Lachnospira e Dialister em menor número	-	-	Haemophilus em menor número	-
[25] Stewart CJ et al., 2016		20 adultos jovens (10 estudo vs 10 controlo)	-	Bacteroides em menor número, mas não estatisticamente significativo	Bifidobacterium em maior número, mas não estatisticamente significativo	-	-
[26] de Groot PF et al., 2017	Holanda	103 pessoas (53 estudo vs 50 controlo)	Espécies produtoras de butirato, particularmente Roseburia, em menor número	-	-	-	-
[27] Pellegrini S et al., 2017	Itália	54 pessoas (19 estudo vs 16 controlo e 19 com doença celíaca)	Em maior número	Em menor número	-	Em menor número	-
[28] Cinek O et al., 2018	Azerbaijão, Jordânia, Nigéria e Sudão	177 jovens (73 estudo vs 104 controlo)	Eubacterium, Roseburia e Clostridium clusters IV ou XIVa em menor número	-	-	Escherichia em maior número. Haemophilus em menor número	-
[29] Higuchi BS et al. 2018	Brasil	48 pessoas (20 estudo vs 28 controlo)	Clostridiales, Ruminococcaceae e Streptococcus em maior número Clostridium em menor número	Parabacteroides e Bacteroides em menor número	Bifidobacterium em menor número	Betaproteobacteria em maior número. Escherichia/Shiguelia em menor número	-

As implicações da Microbiota Intestinal na Diabetes Mellitus tipo 1

[30] Huang Y et al., 2018	China	22 pessoas (12 estudo vs 10 controlo)	Em menor número	Em maior número	-	-	-
[31] Leiva-Gea I et al., 2018	Espanha	43 crianças (30 estudo vs 13 controlo)	Em menor número	Em maior número	Em menor número	Em menor número	-
[32] Vatanen T et al., 2018	Finlândia, Alemanha, Suécia e Estados Unidos	783 crianças (101 estudo vs 415 controlo vs 267 com anticorpos anti-ilhéus)	Streptococcus thermophilus e Lactococcus lactis em maior número. Roseburia hominis em menor número	Alistipes shahii em menor número	Bifidobacterium pseudocatenulatum em menor número	-	-
[33] Traversi D et al., 2020	Itália	106 crianças (40 estudo vs 56 controlo)	Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Christensenella timonensis, Ruminococcus bromii e Urmitella timonensis em maior número	Rikenellaceae, Prevotellaceae, Barnesiellaceae Alistipes senegalensis, Bacteroides timonensis e Barnesiella intestinihominis em maior número	-	-	-
[34] Petrak F et al., 2022	Alemanha	60 adultos (40 estudo vs 20 controlo)	Veillonellaceae e Christensenellaceae em maior número. Lactobacillaceae e Leuconostocaceae em menor número	Em menor número	Em menor número	Succinivibrionaceae e Rhodospirillaceae em maior número	-

4. Discussão

Os diversos estudos demonstraram, na sua maioria, uma diferença significativa entre a microbiota intestinal de indivíduos com DM1 e a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, o que leva a crer que esta possa ter uma influência no desenvolvimento e progressão desta doença.

De entre os resultados, destaca-se o facto de, na maioria dos estudos, o filo Bacteroidetes estar predominantemente aumentado nos diabéticos, mais concretamente o género *Bacteroides* na sua grande maioria (20,21,23,30,31,33), apesar do género *Prevotella*, também pertencente a este filo, se apresentar diminuído em alguns estudos (20,21). Exceção foram os estudos de Pellegrini (27), de Higuchi (29) e de Petrak (34) que apresentaram uma diminuição significativa neste filo nos doentes diabéticos, e também do estudo de Stewart (25), que também apresentou uma diminuição deste filo, mas, em contrapartida, esta não foi significativa. Ao contrário do filo Bacteroidetes, o filo Firmicutes já apresenta maior diversidade de resultados, que depende do género e espécie a que se refere, havendo estudos que apontam para a sua diminuição, na globalidade, em doentes diabéticos (30,31), com exceção do estudo realizado por Pellegrini (27), que indica um aumento deste filo, na generalidade, nos diabéticos. Dentro deste filo, destaque para o facto do género *Lactobacillus*, quando referido, apresentar uma diminuição nos doentes diabéticos (20,23), o género *Streptococcus* apresentar um aumento (23,29,32), o género *Clostridium* apresentar tanto um aumento (20,23) como uma diminuição (23,28) e o género *Roseburia*, produtora de butirato, apresentar uma diminuição (26,28,32). Referência, ainda, ao género *Blautia*, que no estudo de Qi (24) apresentou uma relação positiva com os níveis de HbA1c, concordante com o que foi relatado por Kostic (35) no seu estudo, que mostrou que a riqueza de *Blautia* tinha uma associação positiva com os níveis de glicose.

O estudo de Murri (20) demonstrou que a razão Firmicutes/Bacteroidetes era significativamente menor nos doentes com DM1, comparativamente aos doentes saudáveis, tendo sido observada uma relação negativa entre esta razão e os níveis de glicose e de HbA1c, sendo que o mesmo foi demonstrado no estudo de Leiva-Gea (31). Além desses, o mesmo foi destacado no estudo realizado por Huang (30), que mostrou que a razão Bacteroidetes/Firmicutes estava significativamente aumentada nos diabéticos. Murri (20) também mostrou que o número, significativamente, reduzido de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nos doentes diabéticos estava relacionado com os

níveis elevados de glicose, sendo que isto também foi possível observar no estudo realizado por Higuchi (29), que demonstrou que uma diminuição de microrganismos benéficos, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillales*, acarreta um inadequado controlo glicémico com elevados níveis de HbA_{1c}.

Relativamente ao filo *Actinobacteria* e, mais concretamente, ao género *Bifidobacterium*, a maioria dos estudos refere haver uma diminuição nos doentes diabéticos (20,22,29,31,32,34), com exceção do estudo realizado por Stewart (25), que refere haver um aumento, mas que não foi estatisticamente significativo. Tal como acontece no filo *Firmicutes*, também no filo *Proteobacteria* há uma grande diversidade de resultados, dependendo do género e espécie que é falada, mas destacando, particularmente, o género *Haemophilus*, o estudo realizado por Qi (24) e outro realizado por Cinek (28) demonstraram que este se encontrava diminuídos nos doentes com DM1. No estudo de Petrak (34) destaque para o facto de duas famílias do filo *Proteobacteria*, *Rhodospirillaceae* e *Succinivibrionaceae*, se encontrarem aumentadas nos doentes diabéticos, sendo este filo frequentemente associado a situações de doença.

São vários os mecanismos que podem explicar a relação entre a DM1 e a disbiose intestinal, sendo os seguintes os principais: desregulação imunológica, que leva à destruição das células β pancreáticas; aumento da permeabilidade intestinal; ambiente inflamatório; e translocação bacteriana (29).

Sabe-se que o butirato tem efeitos na permeabilidade e reparação intestinal, na formação de junções de oclusão, na inibição da translocação bacteriana e propriedades anti-inflamatórias (23,28,29), logo a sua redução pode ajudar no desenvolvimento de DM1, através do aumento da permeabilidade e da exacerbação da inflamação (24). Posto isto, a diminuição de espécies produtoras de butirato, como *Eubacterium*, *Roseburia* e alguns clusters de *Clostridium*, como descrita em alguns estudos (20,23,26,28), pode contribuir para este desfecho. Um estudo que reforça a importância do butirato na DM1, foi realizado por de Goffau (36), que demonstrou que as espécies produtoras de butirato têm importância no desenvolvimento da autoimunidade das células β pancreáticas. Um outro estudo, realizado por Maffei C et al. (37) em crianças italianas em risco de desenvolver DM1, também reforçou a ideia de que alterações na microbiota intestinal associadas a um aumento da permeabilidade intestinal poderiam estar relacionadas à condição pré-DM1. Outro estudo que suporta o aqui referido, foi realizado por Gavin P et al. (38), que verificou que doentes com DM1 de início recente já apresentavam uma diminuição da função da barreira intestinal, um aumento da inflamação intestinal e uma disfunção exócrina pancreática prévia à

instalação da doença, sendo que tudo isto também se verificou em indivíduos com alto risco de desenvolver DM1. Para além disso, foi referida a possibilidade de haver um aumento da carga antigénica no lúmen intestinal, levando a uma ativação imunológica e inflamação intestinal, que associado a um aumento da permeabilidade intestinal pode contribuir para a destruição das células β pancreáticas (27).

Siljander H et al. (39), na sua revisão sistemática de estudos sobre a microbiota intestinal e a DM1, também concluíram que havia uma menor diversidade microbiana e/ou uma composição da microbiota intestinal anormal, um maior número de Bacteroides em vez de Firmicutes, um aumento de patógenos oportunistas e uma diminuição do número de espécies produtoras de butirato. Concluiu, ainda, que existe uma permeabilidade intestinal aumentada devido a um comprometimento da integridade da barreira intestinal, um ambiente pró-inflamatório e uma imunidade comprometida, o que é concordante com os estudos aqui analisados.

Assim, percebe-se toda a heterogeneidade à volta da microbiota intestinal, visto que esta também pode ser influenciada por inúmeros fatores, tais como a localização geográfica e a dieta, sendo, por isso, difícil referir as alterações específicas que ocorrem na microbiota intestinal, que possam estar relacionadas com a DM1, ficando-se apenas com a ideia de que há alterações na microbiota intestinal quando comparamos indivíduos diabéticos com indivíduos saudáveis. Além disso, a maioria dos estudos apresenta um grupo de estudo limitado e representado principalmente por crianças, com poucos participantes e que representa apenas parte da população diabética, visto que há estudos que apenas selecionam diabéticos com bom controlo glicémico ou sem complicações (25,26). De referir, ainda, que a maioria dos estudos tem como amostra a microbiota do intestino grosso ou fecal, o que pode não ser representativo daquilo que é a microbiota intestinal no geral, visto que a microbiota duodenal, por exemplo, pode apresentar diferenças significativas, quando comparada às anteriores, aliado ao facto de nem todos os estudos usarem o mesmo método de análise, o que pode implicar diferentes sensibilidades (28,33). Em contrapartida, os estudos aqui descritos são, relativamente, recentes e tentaram agrupar os casos e controlos de acordo com características fisiológicas semelhantes.

Posto isto, no futuro, seria importante os estudos apresentarem mais homogeneidade, com critérios de inclusão e exclusão bem delineados, utilizarem a mesma técnica de recolha e análise da microbiota intestinal, assim como o mesmo material, sob as mesmas condições e englobarem mais áreas do globo. Tudo isto de maneira a esclarecer se de facto alterações na microbiota intestinal são causa ou

consequência da DM1, tendo em conta que a maioria dos estudos aqui referidos dá conta que indivíduos diabéticos têm uma microbiota alterada quando comparada à de indivíduos saudáveis, mas não conseguem concluir se isso não poderá ser devido a consequências da doença, como, por exemplo, do aumento da glicemia, das mudanças no estilo de vida que possam ocorrer após o diagnóstico, entre outros. Um estudo que dá conta disso mesmo, é o estudo realizado por Stewart CJ (25), que demonstrou que indivíduos com DM1, com bom controlo glicémico e altos níveis de capacidade física apresentam uma microbiota intestinal comparável à de indivíduos saudáveis, sem diabetes. Isto realça a ideia de que uma boa gestão da DM1, com recurso a terapêutica farmacológica e mudanças no estilo de vida, pode resultar na alteração da microbiota intestinal, de modo que não se verifiquem diferenças significativas entre indivíduos diabéticos e indivíduos sem a doença.

De referir, também, que a microbiota intestinal ainda é um tema em constante alteração, estudo e debate, que, por isso, poderá ter várias implicações futuras tanto em termos de diagnóstico precoce de determinadas doenças como no seu respetivo tratamento, permitindo uma personalização da medicina, isto é, permitindo obter um tratamento individualizado. Assim, a manipulação da microbiota intestinal parece ser uma estratégia terapêutica com potencial, tal como refere Zhang S (40) na sua revisão sistemática sobre o transplante da microbiota fecal, onde concluiu que o transplante da microbiota fecal pode melhorar o controlo glicémico e a resistência à insulina em indivíduos com DM1. Um outro estudo que vai de encontro ao aqui referido foi realizado por Ho J (41), que concluiu que o uso de prebióticos pode melhorar o controlo glicémico e, por isso, pode ser uma nova terapêutica barata e de baixo risco para a gestão da DM1.

5. Conclusão

Nas últimas décadas, a DM emergiu como uma das doenças com maior prevalência global, sendo uma das causas responsáveis pela grande morbimortalidade mundial. Assim, torna-se necessário combater este aumento de prevalência através das mais diversas formas, desde a prevenção primária até à terciária.

Sabe-se que a microbiota intestinal é responsável por inúmeras funções essenciais a um bom funcionamento do organismo, sendo um dos principais responsáveis pela regulação do estado inflamatório e crucial na regulação imunológica e, por isso, pode ter alguma influência no desenvolvimento e/ou progressão de diversas patologias, nomeadamente a DM. Posto isto, é essencial a manutenção de uma microbiota intestinal saudável de forma a promover a saúde individual.

Tem sido cada vez mais estudado a influência que a microbiota intestinal tem na saúde do indivíduo, tendo sido relatado algumas alterações que podem predispor a determinada patologia. De acordo com a maioria dos estudos, uma diminuição da diversidade da microbiota intestinal aliada a uma redução de bactérias benéficas, envolvidas na permeabilidade intestinal, inflamação e regulação da imunidade, tem sido associada à DM1. No entanto, fica por esclarecer se essas alterações são causa da DM1 ou consequência da mesma, pelo que são necessários estudos mais robustos e com maior homogeneidade metodológica. Estes estudos têm importantes implicações clínicas, no sentido em que permitem uma nova abordagem da DM1, desde a prevenção ao tratamento, que pode passar por modular a microbiota intestinal, de forma a que esta seja favorável a um ambiente saudável e não propício ao desenvolvimento de DM1.

Referências Bibliográficas

1. Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller U, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019 Dec; 127(S1):S1–S7. DOI: 10.1055/a-1018-9078
2. Hossain M, Al-Mamun M, Islam M. Diabetes mellitus, the fastest growing global public health concern: Early detection should be focused. *Health Sci Rep*. 2024 Mar 2022; 7(3):2004. DOI: 10.1002/hsr2.2004
3. Observatório Nacional da Diabetes. Diabetes: Factos e Números 2019, 2020 e 2021. *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2023:8-57. Available from: <https://apdp.pt/3d-flip-book/relatorio-do-observatorio-nacional-da-diabetes/>
4. Elsayed N, Aleppo G, Aroda V, Bannuru R, Brown F, Bruemmer D et al. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*. 2023 Jan; 46(S1):S19–S40. DOI: 10.2337/dc23-S002
5. Cole J, Florez J. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol*. 2020 Jul; 16(7): 377–390. DOI: 10.1038/s41581-020-0278-5
6. WHO. Global Report on Diabetes [Internet]. Geneva: WHO Press; 2016 Apr 21; 10-62. [cited 2024 Jan]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565257>
7. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022 Jan; 183:109119. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109119
8. Ogurtsova K, Guariguata L, Barengo N, Ruiz P, Sacre J, Karuranga S et al. IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022 Jan; 183:109118. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109118
9. Durazzo M, Ferro A, Gruden G. Gastrointestinal microbiota and type 1 diabetes mellitus: The state of art. *J Clin Med*. 2019 Nov 2; 8(11): 1843. DOI: 10.3390/jcm8111843
10. Knip M, Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2016 Mar; 12(3):154–67. DOI: 10.1038/nrendo.2015.218
11. Gebrayel P, Nicco C, Al Khodor S, Bilinski J, Caselli E, Comelli E et al. Microbiota medicine: towards clinical revolution. *J Transl Med*. 2022 Mar 7; 20(1):111. DOI: 10.1186/s12967-022-03296-9

12. Abdellatif A, Sarvetnick N. Current understanding of the role of gut dysbiosis in type 1 diabetes. *J Diabetes*. 2019 Aug; 11(8): 632–644. DOI: 10.1111/1753-0407.12915
13. Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, Lopetuso L, Scaldaferri F. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern Emerg Med*. 2024 Mar; 19(2):275–293. DOI: 10.1007/s11739-023-03374-w
14. Senchukova M. Microbiota of the gastrointestinal tract: Friend or foe? *World J Gastroenterol*. 2023 Jan 7; 29(1): 19–42. DOI: 10.3748/wjg.v29.i1.19
15. Colella M, Charitos I, Ballini A, Cafiero C, Topi S, Palmirotta R et al. Microbiota revolution: How gut microbes regulate our lives. *World J Gastroenterol*. 2023 Jul 28; 29(28):4368–4383. DOI: 10.3748/wjg.v29.i28.4368
16. Thriene K, Michels KB. Human Gut Microbiota Plasticity throughout the Life Course. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Jan 13; 20(2):1463. DOI: 10.3390/ijerph20021463
17. Harmsen H, Goffau M. The human gut microbiota. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 902: 95–108. DOI: 10.1007/978-3-319-31248-4_7
18. Bondy S. Relationships between Diabetes and the Intestinal Microbial Population. *Inter J Mol Sci*. 2022 Dec 29; 24(1): 566. DOI: 10.3390/ijms24010566
19. Guo J, Han X, Huang W, You Y, Zhan J. Gut dysbiosis during early life: causes, health outcomes, and amelioration via dietary intervention. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022; 62(26):7199-7221. DOI: 10.1080/10408398.2021.1912706
20. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero J, Tinahones F, Cardona F, Soriguer F et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: A case-control study. *BMC Med*. 2013 Feb 21; 11:46. DOI: 10.1186/1741-7015-11-46
21. Mejía-León M, Petrosino J, Ajami N, Domínguez-Bello M, De La Barca A. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Sci Rep*. 2014 Jan 22; 4:3814. DOI: 10.1038/srep03814
22. Soyucen E, Gulcan A, Aktuglu-Zeybek A, Onal H, Kiykim E, Aydin A. Differences in the gut microbiota of healthy children and those with type 1 diabetes. *Pediatr Int*. 2014 Jun; 56(3):336–343. DOI: 10.1111/ped.12243
23. De Goffau M, Fuentes S, Van Den Bogert B, Honkanen H, De Vos W, Welling G et al. Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children. *Diabetologia*. 2014 Aug; 57(8):1569–1577. DOI: 10.1007/s00125-014-3274-0

24. Qi C, Zhang Q, Yu M, Xu J, Zheng J, Wang T et al. Imbalance of fecal microbiota at newly diagnosed type 1 diabetes in Chinese children. *Chin Med J (Engl)*. 2016 Jun 5; 129(11):1298–12304. DOI: 10.4103/0366-6999.182841
25. Stewart C, Nelson A, Campbell M, Walker M, Stevenson E, Shaw J et al. Gut microbiota of Type 1 diabetes patients with good glycaemic control and high physical fitness is similar to people without diabetes: an observational study. *Diabet Med*. 2017 Jan; 34(1):127–134. DOI: 10.1111/dme.13140
26. De Groot P, Belzer C, Aydin Ö, Levin E, Levels J, Aalvink S et al. Distinct fecal and oral microbiota composition in human type 1 diabetes, an observational study. *PLoS One*. 2017 Dec 6; 12(12): e0188475. DOI: 10.1371/journal.pone.0188475
27. Pellegrini S, Sordi V, Bolla A, Saita D, Ferrarese R, Canducci F et al. Duodenal mucosa of patients with type 1 diabetes shows distinctive inflammatory profile and microbiota. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 May 1; 102(5):1468–1477. DOI: 10.1210/jc.2016-3222
28. Cinek O, Kramna L, Mazankova K, Odeh R, Alassaf A, Ibekwe M et al. The bacteriome at the onset of type 1 diabetes: A study from four geographically distant African and Asian countries. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 Oct; 144:51–62. DOI: 10.1016/j.diabres.2018.08.010
29. Higuchi B, Rodrigues N, Gonzaga M, Paiolo J, Stefanutto N, Omori W et al. Intestinal dysbiosis in autoimmune diabetes is correlated with poor glycemic control and increased interleukin-6: A pilot study. *Front Immunol*. 2018 Jul 25; 9:1689. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01689
30. Huang Y, Li S, Hu J, Ruan H, Guo H, Zhang H et al. Gut microbiota profiling in Han Chinese with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 Jul; 141:256–263. DOI: 10.1016/j.diabres.2018.04.032
31. Leiva-Gea I, Sánchez-Alcoholado L, Martín-Tejedor B, Castellano-Castillo D, Moreno-Indias I, Urda-Cardona A et al. Gut microbiota differs in composition and functionality between children with type 1 diabetes and MODY2 and healthy control subjects: A case-control study. *Diabetes Care*. 2018 Nov; 41(11):2385–2395. DOI: 10.2337/dc18-0253
32. Vatanen T, Franzosa E, Schwager R, Tripathi S, Arthur T, Vehik K et al. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature*. 2018 Oct; 562(7728):589–594. DOI: 10.1038/s41586-018-0620-2
33. Traversi D, Rabbone I, Scaioli G, Vallini C, Carletto G, Racca I et al. Risk factors for type 1 diabetes, including environmental, behavioural and gut microbial

- factors: a case–control study. *Sci Rep.* 2020 Oct 16; 10(1): 17566. DOI: 10.1038/s41598-020-74678-6
34. Petrak F, Herpertz S, Hirsch J, Röhrig B, Donati-Hirsch I, Juckel G et al. Gut microbiota differs in composition between adults with type 1 diabetes with or without depression and healthy control participants: a case-control study. *BMC Microbiol.* 2022 Jun 28; 22(1):169. DOI: 10.1186/s12866-022-02575-1
35. Kostic A, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Hyötyläinen T, Hämäläinen A et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe.* 2015 Feb;17(2):260-273. DOI: 10.1016/j.chom.2015.01.001
36. Goffau M, Luopajarvi K, Knip M, Ilonen J, Ruohtula T, Härkönen T et al. Fecal microbiota composition differs between children with β -cell autoimmunity and those without. *Diabetes.* 2013 Apr;62(4):1238–1244. DOI: 10.2337/db12-0526
37. Maffei C, Martina A, Corradi M, Quarella S, Nori N, Torriani S et al. Association between intestinal permeability and faecal microbiota composition in Italian children with beta cell autoimmunity at risk for type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016 Oct; 32(7):700-709. DOI: 10.1002/dmrr.2790
38. Gavin P, Mullaney J, Loo D, Lê Cao K, Gottlieb P, Hill M et al. Intestinal Metaproteomics Reveals Host - Microbiota Interactions in Subjects at Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2018 Oct; 41(10):2178-2186. DOI: 10.2337/dc18-0777
39. Siljander H, Honkanen J, Knip M. Microbiome and type 1 diabetes. *EBioMedicine.* 2019 Aug; 46:512-521. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.06.031
40. Zhang S, Deng F, Chen J, Chen F, Wu Z, Li L et al. Fecal microbiota transplantation treatment of autoimmune-mediated type 1 diabetes: A systematic review. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Dec 1; 12:1075201. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1075201
41. Ho J, Nicolucci A, Virtanen H, Schick A, Meddings J, Reimer R et al. Effect of Prebiotic on Microbiota, Intestinal Permeability, and Glycemic Control in Children With Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 Oct 1; 104(10):4427-4440. DOI:10.1210/jc.2019-0048