

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**INFLUÊNCIA DE BACTÉRIAS E SEUS METABÓLITOS NA MICROBIOTA
INTESTINAL E NO CONTROLE GLICÊMICO EM DECORRÊNCIA DO USO DA
METFORMINA PARA O TRATAMENTO DA DIABETES DO TIPO 2**

Jean Vinicius Serafim da Silva

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientadora:
Prof^ª. Dra. Carla Taddei de Castro
Neves

São Paulo
2023

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo geral	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
4. DISCUSSÃO	10
4.1. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	10
4.2. Metformina	11
4.3. Microbiota Intestinal	12
4.4. Relação entre microbiota intestinal e o controle glicêmico	16
4.4.1. Mecanismos de regulação	16
4.4.1.1. Secreção de Incretinas	17
4.4.1.2. Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)	18
4.4.1.2.1. AGCCs e homeostase da glicose e disfunção pancreática	20
4.4.1.2.2. AGCCs e função imunológica	23
4.4.1.2.3. AGCCs e integridade intestinal	24
4.4.1.3. Metabolismo de ácidos biliares	25
4.4.1.4. Inflamação do tecido adiposo e controle da endotoxemia	28
4.5. Sinalização inflamatória e ação da insulina	32
4.5.1. Como os sinais inflamatórios interrompem a ação da insulina e medeiam a resistência à insulina na obesidade?	32
4.6. MICROBIOTA DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS 2 (DM2)	33
4.7. AÇÃO DA METFORMINA	35
4.7.1. A metformina promove o aumento de <i>Akkermansia muciniphila</i>	35
4.7.2. A metformina promove bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)	38
4.7.3. A metformina regula a renovação dos ácidos biliares	38
4.7.4. A metformina mantém a integridade da barreira intestinal	40
4.7.5. A metformina aumenta a secreção de peptídeos relacionados ao intestino	42
4.7.6. A metformina modula a resposta imune	43

5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG	2-oxoglutarato
ADH	Alfa-desidroxilase - <i>Alpha-dehydroxylase</i>
ADP	Adenosina Difosfato - <i>Adenosina DiPhosphate</i>
AGCCs	Ácidos graxos de cadeia curta - <i>Short chain fatty acids</i>
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
AGCM	Ácido graxo de cadeia média
AGLs	Ácidos graxos livres
AMP	Adenosina monofosfato - <i>Adenosine monophosphate</i>
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico - <i>Adenosine3',5'-cyclic monophosphate</i>
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina - <i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ATP	Adenosina trifosfato - <i>Adenosine TriPhosphate</i>
BSH	Hidrolases de sais biliares - <i>Bile Salt Hydrolase</i>
CB1	Receptor endocanabinóide 1 - <i>Cannabinoid receptor 1</i>
CB2	Receptor endocanabinóide 2 - <i>Cannabinoid receptor 2</i>
CYP7A1	Citocromo P450 7A1
DCA	Ácido desoxicólico - <i>Deoxycholic acid</i>
DII	Doença inflamatória intestinal
DPP4	Dipeptidil-peptidase 4
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EVs	Vesículas extracelulares - <i>Extracellular vesicles</i>
FIAF	Fator adiposo induzido por jejum - <i>Fasting-induced adipose factor</i>
FFAR2	Receptor de ácido graxo livre 2 - <i>Free fatty acid receptor 2</i>
FFAR3	Receptor de ácido graxo livre 3 - <i>Free fatty acid receptor 3</i>
FGF19	Fator de crescimento de fibroblastos 19 - <i>Fibroblast Growth Factor 19</i>
FXR	Receptor nuclear farnesóide - <i>Farnesoid X receptor</i>
GIP	Polipeptídeo inibidor gástrico - <i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>

GLP-1 <i>Peptide-1</i>	Peptídeo-1 semelhante ao glucagon - <i>Glucagon-like</i>
GLP-2 <i>Peptide-2</i>	Peptídeo-2 semelhante ao glucagon - <i>Glucagon-like</i>
GLUT-2	Transportador de glicose 2 - <i>Glucose transporter 2</i>
GLUT-4	Transportador de glicose 4 - <i>Glucose transporter 4</i>
GPR41	Receptor acoplado à proteína G41
GPR43	Receptor acoplado à proteína G43
H2S	Sulfeto de hidrogênio
HDAc	Histona desacetilase - <i>Histone Deacetylase</i>
HFD	<i>High Fat Diet</i>
HSDH <i>dehydrogenase</i>	Hidroxiesteróide desidrogenase - <i>Hydroxysteroid</i>
IEC	Célula epitelial intestinal - <i>Intestinal epithelial cell</i>
IGF-1 <i>Insulin-like growth factor-1</i>	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 -
IGN	Gliconeogênese intestinal - <i>Intestinal gluconeogenesis</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IKK β	Quinase β
IRS <i>substrates</i>	Substratos de receptores de insulina - <i>Insulin receptor</i>
ISCs	Células Tronco Intestinais - <i>Intestinal Stem Cells</i>
JNK	c-Jun NH2-quinase terminal - <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LBP <i>Binding Protein</i>	Proteína de ligação a polissacarídeos - <i>Lipopolysaccharide</i>
LCA	Ácido litocólico - <i>Lithocholic acid</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade - <i>Low-density lipoprotein</i>
LPL	Lipase lipoproteica - <i>Lipoprotein lipase</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAM <i>anti-inflammatory molecule</i>	Molécula anti inflamatória microbiana - <i>Microbial</i>
MUC2	Mucina 2
MUC5	Mucina 5

NF-kB	Fator nuclear kappa b - <i>Nuclear factor kappa B</i>
OCTs <i>transporters</i>	Transportadores de cátions orgânicos - <i>Organic cation</i>
OXPPOS <i>phosphorylation</i>	Fosforilação oxidativa mitocondrial - <i>Oxidative</i>
PEPCK <i>carboxykinase</i>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase - <i>Phosphoenolpyruvate</i>
PPAR- α	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais alfa - <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha</i>
PPAR-g	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama - <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>
PYY	Peptídeo tirosina-tirosina
RI	Resistência insulínica (RI)
SGLT-1 <i>Cotransporters 1</i>	Cotransportador de sódio-glicose-1 - <i>Sodium Glucose</i>
TCA	Ácido tricarboxílico - <i>Tricarboxylic acid</i>
TGR5	Receptor acoplado à proteína G de membrana
TJP	Proteínas de junção estreita - <i>Tight Junction Proteins</i>
TLR2	Receptor Toll-Like 2 - <i>Toll like receptor 2</i>
TLR4	Receptor Toll-Like 4 - <i>Toll like receptor 4</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α - <i>Tumour necrosis factor alpha</i>
Tregs	Células T reguladoras - <i>Regulatory T cells</i>
ZO-1	Proteína de junção estreita 1 - <i>Zonula Occludens-1</i>

RESUMO

SILVA, JVS. **Influência de bactérias e seus metabólitos na microbiota intestinal e no controle glicêmico em decorrência do uso da metformina para o tratamento da diabetes do tipo 2.** Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras-chave: Metformina, diabetes tipo 2, *Akkermansia muciniphila*, ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), microbiota intestinal, *Roseburia intestinalis*, ácidos biliares, endotoxemia.

INTRODUÇÃO: A diabetes é uma doença crônica que compromete a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos seus portadores. Medicamentos antidiabéticos como a metformina são utilizados para o controle da doença. Além de atuar no controle glicêmico, estudos indicam uma relação entre a microbiota e o uso do fármaco, mostrando uma influência na alteração da composição da mesma. Ademais, bactérias intestinais e seus metabólitos, conseguem desempenhar funções fundamentais em doenças como diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares por meio de diversos mecanismos.

OBJETIVO: O presente trabalho teve como objetivo trazer uma revisão à luz da literatura atual sobre os mecanismos pelos quais a microbiota interfere no controle em decorrência do uso de metformina.

MATERIAIS E MÉTODOS: Para a identificação dos estudos que abordaram o tema desta revisão bibliográfica, foram consultados artigos científicos acessados de base de dados como Pubmed®, teses, livros, dissertações e revistas científicas. A pesquisa foi realizada a partir de palavras-chaves sobre o tema, em português e inglês, tais como “*Metformin and diabetes*”, “*Akkermansia muciniphila and diabetes*”, “*short chain fatty acids and diabetes*”, “*metformin and gut microbiota*” etc.

DISCUSSÃO: Entendimentos acerca das relações entre a microbiota intestinal estão cada vez mais compreendidos. Pelo fato de exercer forte influência na homeostase energética do corpo, a sua disbiose, em pacientes com DM2, apresenta efeitos negativos no controle glicêmico do hospedeiro. A metformina, um fármaco de primeira linha usado no tratamento da DM2, exerce ações que auxiliam no controle da glicose de modo a garantir uma microbiota mais saudável.

CONCLUSÃO: Embora não haja um consenso a respeito de todas as bactérias afetadas e mecanismos envolvendo metformina, é entendido que ela exerce funções importantes na microbiota que auxiliam no seu mecanismo de ação hipoglicemiante por meio de vias que envolvem diferentes órgãos e tecidos. Devido a composição e riqueza da microbiota serem modulados pela dieta, saúde do hospedeiro, idade, etnia, genética, etc, há uma dificuldade na comparação entre estudos. Futuras investigações ainda são necessárias para esclarecer em mais detalhes alguns mecanismos hipoglicemiantes da metformina.

1. INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada por um distúrbio no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, relacionado com a produção e/ou funcionalidade da insulina. De todos os diagnósticos de DM, aproximadamente 90% são do tipo 2. Estima-se que até 2030 pelo menos 360 milhões de pessoas desenvolvam a doença [SILVA et al., 2021].

Há quatro tipos de diabetes: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), gestacional e pré-diabetes. A diabetes mellitus tipo 2 é diagnosticada pela presença de níveis elevados de glicose no sangue [GÉRARD, VIDAL, 2019], em um quadro clínico denominado hiperglicemia (glicose > 130 mg/dL) [SILVA et al., 2021]. Na DM2, as células do corpo tornam-se resistentes à insulina, muitas vezes devido a defeitos no funcionamento do seu receptor, e não respondem adequadamente a ela. Assim, os níveis deste hormônio no sangue são praticamente inalterados ou elevados [SOBCZAK et al., 2019]. No entanto, a DM2 também pode evoluir para uma deficiência através da perda da função de armazenamento e secreção de insulina pelas células β do pâncreas [SOBCZAK et al., 2019].

Para o tratamento, o objetivo é a preservação do máximo de massa de células β pancreáticas, produtoras de insulina. Há várias medicações que podem ser prescritas, dentre elas, a metformina, um fármaco que melhora a sensibilidade insulínica das células do paciente [LEE, KO, 2014].

A metformina tem sido usada para tratar a diabetes desde o início da década de 1950. Ela pertence à classe das biguanidas, medicamentos derivados das guanidinas, e é recomendada pela *American Diabetes Association* como medicamento de primeira linha para o tratamento de DM2 [LEE et al., 2021]. Sua ação inclui o suprimento da produção de glicose no fígado (gliconeogênese hepática), aumento da sensibilidade à insulina e captação periférica de glicose no fígado e músculo esquelético [LEE, KO, 2014]. Além disso, foi demonstrado que ela também exerce alterações na microbiota intestinal por meio de mudanças nas proporções relativas de algumas bactérias de vários níveis taxonômicos [ZHANG, HU, 2020], como a *Akkermansia muciniphila* e de outros microrganismos produtores de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs - *Short chain fatty acids*), além de promover interferência no metabolismo de ácidos biliares, estímulo na liberação de hormônios peptídeos, regulação do tecido adiposo, melhora da permeabilidade

intestinal e no controle de processos inflamatórios [VALLIANOU et al., 2019]. Tais atividades estão associadas à sua eficácia terapêutica para o metabolismo da glicose, bem como à sua ação antiobesidade e anti-inflamatória. Contudo, seus mecanismos clássicos de ação, tais como a supressão da gliconeogênese hepática, mantêm a sua importância em pacientes diabéticos [VALLIANOU et al., 2019].

No intestino, as suas concentrações são cerca de 100 a 300 vezes superiores às do plasma, o que faz dele o reservatório primário do medicamento [VALLIANOU et al., 2019], importante local de captação para a corrente sanguínea [MCCREIGHT et al., 2016], além de aumentar o tempo de efeito da metformina no paciente [MINAMII et al., 2018]. Através de hipóteses de que ela exerce ação no trato gastrointestinal, estudos com o microbioma intestinal sugerem ser esse o potencial fator chave para o tratamento de DM2 e mediador da ação da metformina [LEE et al., 2021].

A microbiota intestinal pode ser definida como um sistema de microrganismos na mucosa do trato gastrointestinal que vivem simbioticamente com o hospedeiro. Existem diferentes comunidades de microrganismos pelo corpo, incluindo na cavidade oral, vaginal, cólon e pele, por exemplo. Há cerca de 10 vezes mais células bacterianas do que humanas no sistema gastrointestinal. Com funções que vão desde o auxílio na absorção de nutrientes até proteção contra patógenos, regulação da função imunológica e o fortalecimento das barreiras bioquímicas do intestino, a baixa diversidade microbiana no intestino está ligada à obesidade e diabetes tipo 2 [Medical News Today, 2022].

A microbiota consiste em milhares de microrganismos, sendo composta por mais de 1500 espécies bacterianas, distribuídas em mais de 50 filos diferentes que incluem *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, os filos mais predominantes, seguidos por *Proteobactérias*, *Fusobacterias*, *Tenericutes*, *Actinobactérias* e *Verrucomicrobias*. Tais microrganismos compõem em até 90% da população microbiana total em humanos. A formação da microbiota intestinal inicia-se no nascimento, e a modificação da sua composição é dependente de vários fatores como genéticos, nutricionais e ambientais (GOMMA, 2020).

Alterações de composição e função da microbiota, denominada disbiose, são características comuns de várias patologias, incluindo doenças metabólicas como a obesidade e DM2 [GÉRARD, VIDAL, 2019].

Existem vários estudos que relacionaram a disbiose da microbiota ao aparecimento de resistência à insulina e diabetes, principalmente alterações na permeabilidade intestinal, endotoxemia, interação com ácidos biliares, alterações na proporção de tecido adiposo marrom e efeitos associados ao uso de drogas como a metformina, além de processos inflamatórios [MUÑOZ-GARACH et al., 2016]. Estudos têm mostrado a capacidade de microrganismos da microbiota e provenientes de suplementações na influência sistêmica do organismo [SILVA et al., 2021].

Entender de forma mais aprofundada como a microbiota interage com o organismo tem implicações relevantes na prevenção e tratamento de várias doenças metabólicas. Levando em consideração a grande incidência de DM2, várias investigações têm sido desenvolvidas visando avanços terapêuticos relacionados à doença. Pelo fato da microbiota contribuir de forma ampla para o equilíbrio energético, ela pode exercer forte influência no distúrbio metabólico, e uma melhor compreensão, a respeito de como ela modula a glicose, pode ser útil para o tratamento de pacientes com DM2 que falham no tratamento com metformina, sendo possível a utilização de diretrizes dietéticas como o uso de probióticos e bioterapêuticos, por exemplo [LEE et al., 2021].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este Trabalho de Conclusão de Curso teve como objetivo trazer uma revisão à luz da literatura atual sobre a compreensão da influência da metformina na microbiota intestinal bem como a modulação em sua composição com consequente influência no controle glicêmico por meio de suas bactérias e de substâncias produzidas pelas mesmas.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal regula o controle glicêmico;
- Descrever os mecanismos de ação da metformina na microbiota intestinal com consequente influência no metabolismo da glicose;
- Descrever a composição da microbiota em indivíduos saudáveis e pacientes diabéticos;
- Descrever a ação e a importância de grupos bacterianos e os metabólitos produzidos por eles na homeostase energética do corpo humano;
- Descrever as consequências de alterações na microbiota intestinal no controle glicêmico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para identificar os estudos que abordam o tema desta revisão bibliográfica, foram consultados artigos científicos acessados de base de dados como Pubmed®, teses, livros, dissertações e revistas científicas. A pesquisa foi realizada com base em palavras chaves sobre o tema, em inglês, tais como “*Metformin and diabetes*”, “*Akkermansia muciniphila and diabetes*”, “*short chain fatty acids and diabetes*”, “*metformin and gut microbiota*” etc. Os artigos pesquisados tiveram um intervalo de 19 anos, com publicações entre 2004 e 2023.

Como critério de exclusão foram selecionados artigos que continham o termo no abstract ou nas palavras-chave, porém não mencionaram em seu corpo textual ou não abordavam o papel da metformina ou microbiota no controle glicêmico.

4. DISCUSSÃO

4.1. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

A diabetes mellitus tipo 2 é um distúrbio metabólico causado principalmente por dois fatores: secreção deficiente de insulina pelas células β pancreáticas e a incapacidade de resposta dos tecidos sensíveis à insulina, denominada resistência insulínica (RI) [GALICIA-GARCIA et al., 2020], levando a defeitos no metabolismo de glicose e inflamação crônica de baixo grau [PATTERSON et al., 2016], cujo principal achado é a hiperglicemia crônica [KERNER, BRÜCKEL, 2014]. Conforme a doença vai avançando, a secreção de insulina é incapaz de manter a homeostase da glicose [GALICIA-GARCIA et al., 2020].

Pacientes com DM2 são, em sua maioria, obesos ou apresentam maiores percentuais de gordura corporal, principalmente na região abdominal e a epidemiologia da doença é afetada por fatores genéticos e ambientais. Os fatores genéticos exercem o seu efeito após exposição a um estilo de vida caracterizado pelo sedentarismo e ingestão elevada de calorias, embora estudos têm mostrado que muitos casos de DM2 podem ser prevenidos por meio da melhora dos fatores alimentares e realização de atividade física [GALICIA-GARCIA et al., 2020].

Em relação à fisiopatologia da doença, a hiperglicemia acontece devido ao mau funcionamento dos ciclos de feedback entre a ação da insulina e a sua secreção. Na deficiência das células β , a secreção é reduzida e na RI há a diminuição da captação de glicose tanto no músculo, fígado e tecido adiposo e aumento na produção de glicose pelo fígado [GALICIA-GARCIA et al., 2020].

A liberação de insulina por células β é ativada em especial por elevadas concentrações de glicose, ácidos graxos, aminoácidos e hormônios [GALICIA-GARCIA et al., 2020]. Em maiores detalhes, quando a glicose entra nas células β , o catabolismo deste açúcar eleva as quantidades de ATP/ADP (*Adenosine TriPhosphate e Adenosina DiPhosphate, respectivamente*) intracelular, o que induz o fechamento dos canais de potássio que são dependentes de ATP. O fechamento desses canais leva à despolarização da membrana e à abertura dos canais de cálcio (Ca^{2+}), permitindo com que ele entre na célula. O seu aumento intracelular estimula a ação dos grânulos contendo insulina, resultando na exocitose deste hormônio ([GALICIA-GARCIA et al., 2020]).

Outros sinais também ajudam na liberação do hormônio, entre eles a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC - *Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate*), um dos mensageiros mais importantes que potencializa a liberação [GALICIA-GARCIA et al., 2020].

4.2. Metformina

Classificada como uma biguanida, a metformina reduz os níveis de glicose no sangue por meio da diminuição na produção de glicose no fígado e na absorção intestinal, além do aumento da sensibilidade à insulina [CORCORAN, JACOBS, 2023], embora esses mecanismos não sejam ainda totalmente compreendidos [MONTANDON, JORNAYVAZ, 2017]. Ela leva aproximadamente 3 horas para exercer efeito após a sua administração, sendo, posteriormente, eliminada pelos rins. Diarreia, náuseas e vômitos são os efeitos adversos gastrointestinais mais comuns, afetando até 30% dos pacientes [CORCORAN, JACOBS, 2023] e a sua boa reputação é devido à sua eficácia terapêutica, baixo custo, segurança, neutralidade de peso e ausência de hipoglicemia como efeito adverso [SANCHEZ-RANGEL, INZUCCHI, 2017]. A biodistribuição e farmacodinâmica dependem de transportadores para compostos catiônicos, a exemplo dos transportadores de cátions orgânicos (OCTs - *Organic cation transporters*) e transportadores de monoaminas da membrana plasmática [FORETZ et al., 2023].

Sendo a primeira linha de tratamento para a DM2, os efeitos pleiotrópicos da metformina sugerem que ela atua em diversos órgãos por meio de vários mecanismos [FORETZ et al., 2019]. Embora seja aceito que o efeito anti-hiperglicêmico é devido principalmente à sua ação no fígado, dados sugerem benefícios vindos de ações também no intestino [FORETZ et al., 2019]. A maioria dos efeitos são, em sua maioria, através da ativação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK - *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*) no fígado e músculo esquelético [KYRIACHENKO et al., 2019].

Fígado, trato gastrointestinal e rins são os principais locais de captação da metformina. No fígado, a metformina controla a produção hepática de glicose por meio de mecanismos dependentes e independentes de AMPK [FORETZ et al., 2023], desempenhando efeitos na regulação da captação de glicose, gliconeogênese, glicólise e síntese de glicogênio [PERNICOVA, KORBONITS, 2014].

Embora os meios precisos de ação da metformina na gliconeogênese permaneçam um assunto de debate [LAMOIA, SHULMAN, 2021], desde o início dos anos 2000, as mitocôndrias são consideradas como organelas-alvo. No fígado, o fármaco inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial de maneira fraca e reversível. Como consequência, há uma diminuição na síntese de ATP por fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS - *Oxidative phosphorylation*) e aumento nas quantidades de adenosina monofosfato (AMP - *Adenosine monophosphate*). Pelo fato da gliconeogênese ser dependente de ATP como fonte de energia [FORETZ et al., 2023], consumindo seis moléculas para cada glicose sintetizada [RENA et al., 2017], as baixas concentrações de ATP diminuem o fluxo gliconeogênico hepático [FORETZ et al., 2023]. Aliado a isso, os níveis elevados de AMP inibem enzimas envolvidas na gliconeogênese, como a adenilato ciclase e a frutose-1-6-bifosfatase, contribuindo, assim, para a redução na produção de glicose [FORETZ et al., 2023].

Além de alterações na composição da microbiota, que serão discutidas ao longo do presente trabalho, a metformina possui ações diretas nas células intestinais. Dentre elas, a inibição da absorção intestinal da glicose dietética por meio da redução na expressão dos transportadores de sódio-glicose 1 (SGLT-1 - *Sodium Glucose Cotransporters 1*) presentes nas membranas dos enterócitos [FORETZ et al., 2023].

No tecido adiposo marrom, o antidiabético aumenta a quantidade de marcadores envolvidos na proliferação e diferenciação celular em adipócitos marrons, bem como a promoção da oxidação mitocondrial de ácidos graxos nas células marrons, efeitos anti-inflamatórios e lipólise intracelular de triglicerídeos [FORETZ et al., 2023]. Estudos em humanos e camundongos mostraram que há também mudanças na composição da microbiota de pacientes diabéticos de modo a torná-la mais semelhante com a de hospedeiros saudáveis [ADESHIRLARIJANEY, GEWIRTZ, 2020] e que as alterações induzidas são revertidas após a descontinuação de metformina, retornando para a composição base [BRYRUP et al., 2019].

4.3. Microbiota Intestinal

A microbiota é composta majoritariamente por bactérias, mas também por vírus, fungos e células eucarióticas. O número de microrganismos no intestino é em

torno de 1×10^{14} , o que abrange cerca de 10 vezes mais células bacterianas do que humanas (1×10^{13}) e cerca de 100 vezes a quantidade de conteúdo genômico (microbioma) [VALLIANOU et al., 2019].

Em relação aos aspectos funcionais da microbiota, há o metabolismo de nutrientes a partir da dieta e xenobióticos, proteção antimicrobiana pela presença de duas camadas de muco, sendo a camada interna mais densa sem a presença de nenhum microrganismo, enquanto a mais externa é dinâmica e fornece glicanos como fonte de nutrição para os organismos. Imunomodulação intestinal em conjunto com o sistema imunológico inato e adaptativo, manutenção da estrutura e função da integridade da barreira intestinal e do trato gastrointestinal são outras funções [JANDHYALA et al., 2015].

Firmicutes é o filo mais abundante, representando cerca de 60 a 80% da composição e incluem mais de 200 gêneros bacterianos, dentre eles os *Ruminococcus*, *Clostridium* e *Lactobacillus* [PITOCCO et al., 2020]. De 20 a 30% temos os Bacteroidetes, sobretudo *Bacteroides*, *Prevotella* e *Xylanibacter*, há uma minoria de aproximadamente 10% de *Actinobactérias*, com predominância do gênero *Bifidobacterium* e, por fim, o filo *Proteobacteria* representando menos de 1%. A figura abaixo ilustra a predominância destas bactérias [MUÑOZ-GARACH et al., 2016].

Figura 1 – Proporções de bactérias predominantes na microbiota humana de indivíduos saudáveis.

Table 1 Bacteria predominating in human microbiota.
<i>Firmicutes (60–80%)</i>
<i>Ruminococcus</i>
<i>Clostridium</i>
<i>Lactobacillus</i>
<i>Bacteroidetes (20–30%)</i>
<i>Bacteroides</i>
<i>Prevotella</i>
<i>Xylanibacter</i>
<i>Actinobacteria (<10%)</i>
<i>Bifidobacterium</i>
<i>Proteobacteria (<1%)</i>
<i>Escherichia</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>

Fonte: [MUÑOZ-GARACH et al., 2016].

Recentemente, na primeira metade de 2022, o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia dos EUA atualizou o nome de alguns filios bacterianos e os maiores afetados incluíram *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*. *Firmicutes* agora é *Bacillota* e *Proteobacteria* se tornou *Pseudomonadota*, enquanto *Actinobacteria* passou a ser *Actinomycetota* e *Bacteroidetes* virou *Bacteroidota*, conforme resumido na figura 2 [NCBI INSIGHTS, 2022]. Devido ao fato de que muitos artigos usados como referência de pesquisa foram publicados em datas anteriores a esta mudança de nomenclatura, então este TCC utilizará a denominação antiga ao longo da estrutura textual.

Figura 2 - Nomenclaturas antigas e atuais de alguns filios bacterianos.

Current name	New name
Firmicutes	Bacillota
Proteobacteria	Pseudomonadota
Actinobacteria	Actinomycetota
Bacteroidetes	Bacteroidota

Fonte: [NCBI INSIGHTS, 2022]

O filo *Firmicutes* exerce um papel relevante na saúde humana. Muitos membros deste filo degradam carboidratos que não são digeridos por enzimas do corpo, como fibra alimentar e amido resistente, em um processo chamado de fermentação e muitos deles são utilizados como probióticos [LIMA et al., 2017], sendo definidos como: “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014), a exemplo do *Lactobacillus* que é frequentemente encontrado em iogurtes e outros produtos lácteos fermentados. Estas bactérias produzem ácidos graxos de cadeia curta como lactato e substâncias antimicrobianas contra patógenos. Alguns deles pertencem a este filo, como *Clostridium perfringens* causador de infecções gastrointestinais e o *Staphylococcus aureus*, uma causa comum de algumas infecções graves [LIMA et al., 2017].

Bacteroidetes é dividido em seis classes principais: *Bacteroidia*, *Cytophagia*, *Flavobacteriia*, *Chitinophagia*, *Sphingobacteriia* e *Saprospira*. Dentre suas várias

funções, eles são capazes de degradar polímeros complexos e algumas espécies deste filo produzem AGCCs que influenciam as funções intestinais e cerebrais [PAN et al., 2023].

Actinobactérias são gram-positivas e anaeróbicas da qual fazem parte três principais famílias que incluem: *Bifidobacteria*, *Propionibacteria* e *Corynebacteria* e uma aeróbica: *Streptomyces*. *Bifidobactérias* são as mais presentes no intestino humano e apresentam diversos benefícios como o auxílio na manutenção da integridade da barreira intestinal a partir da produção de AGCCs, protegendo o hospedeiro contra patógenos, tais como *Escherichia coli* e *Shigella*. Juntamente com os *Lactobacillus*, as *Bifidobactérias* podem ser usadas como abordagem terapêutica probiótica [BINDA et al., 2018].

As *Proteobactérias* compreendem seis classes bacterianas: *Alfa-*, *Beta-*, *Gama-*, *Delta-*, *Epsilon-* e *Zetaproteobactérias* e todas elas estão presentes em várias partes do corpo humano, mas a maior quantidade se encontra na cavidade oral (17,2–36,8%), seguida da pele (6,8–30,0%), trato gastrointestinal (2,5–4,6%) e vaginal (2,3%) [SHIN, WHON, BAE, 2015]. Muitos patógenos são encontrados nesse filo, a exemplo da *Salmonella*, *Escherichia*, *Helicobacter* e *Shigella* [RIZZATI et al., 2017].

A composição da microbiota é dependente de vários fatores, tais como idade, sexo, etnia, localização geográfica, dieta e família, podendo ser modulada por antibióticos, pré e probióticos [MUÑOZ-GARACH et al., 2016] e até mesmo pelo modo de nascimento [WU et al., 2023]

Nos primeiros dias de vida, logo após o nascimento, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* são os filios que mais predominam na criança. Ao final do primeiro ano de vida, a composição bacteriana começa a adquirir um perfil mais adulto à medida que acontece e se inicia a ingestão alimentar. Após dois anos e meio, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* passam a predominar e, então, a microbiota apresenta um perfil mais próximo a de uma microbiota de um adulto [MUÑOZ-GARACH et al., 2016]. Durante este período, o sistema imune aprende a distinguir bactérias comensais das patogênicas e, ao atingir a maturidade, a microbiota conserva-se de forma estável até a velhice [MUÑOZ-GARACH et al., 2016].

A microbiota intestinal desempenha um papel significativo em muitas funções relacionadas à proteção contra patógenos, melhorando o sistema imune ao colonizar superfícies mucosas e produzir diferentes substâncias antimicrobianas, além de

controlar a proliferação e diferenciação de células epiteliais, influenciar na comunicação cérebro-intestino e também modificar a resistência à insulina, afetando a sua secreção [GOMAA, 2020].

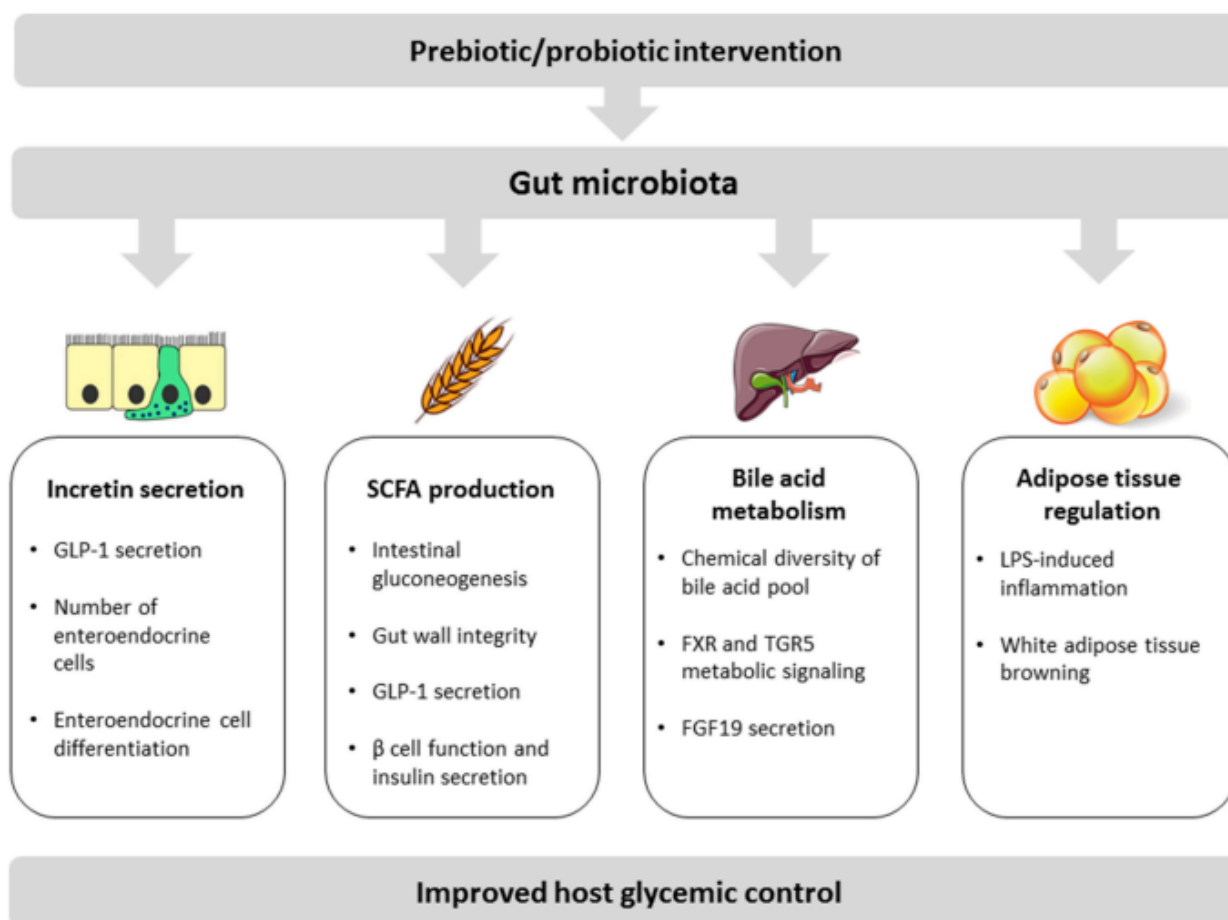
Mudanças na microbiota intestinal são capazes de influenciar negativamente células do epitélio intestinal, aumentando a permeabilidade da mucosa intestinal, estimulando a liberação de LPS e a produção de citocinas inflamatórias [ZHANG, HU, 2020], além de interferir no metabolismo da glicose, dos AGCCs, ácidos biliares, processos inflamatórios e regulação do tecido adiposo.

4.4. Relação entre microbiota Intestinal e o controle glicêmico

4.4.1. Mecanismos de regulação

Secreção de incretinas, produção de ácidos graxos de cadeia curta, ácidos biliares e a regulação do tecido adiposo e funções anti-inflamatórias são os principais meios de regulação da glicemia do hospedeiro pela microbiota, estando todos eles resumidos na imagem abaixo (fig. 3) [GÉRARD, VIDAL, 2019].

Figura 3 – Visão esquemática dos principais mecanismos que ligam a microbiota intestinal à regulação glicêmica do hospedeiro.



Fonte: [GÉRARD, VIDAL, 2019].

4.1.1.1. Secreção de Incretinas

Os hormônios incretina são peptídeos intestinais liberados por células enteroendócrinas, sendo secretados na corrente sanguínea de modo a promover rapidamente a liberação de insulina pelas células β pancreáticas em resposta aos nutrientes. O peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1 - *Glucagon-like Peptide-1*) e o polipeptídeo inibidor gástrico (GIP - *Glucose-dependent insulintropic polypeptide*) são exemplos destes hormônios [GÉRARD, VIDAL, 2019]. A ligação de ambos em seus receptores ativa e aumenta o nível de AMPc intracelular, estimulando a liberação de insulina pelas células pancreáticas [SEINO et al., 2010]. Além dos seus efeitos insulíntricos, eles também desempenham papéis críticos em vários processos biológicos em diferentes tecidos e órgãos incluindo o pâncreas, a gordura, os ossos e o cérebro. Dentro do pâncreas, enquanto o GIP aumenta a

resposta pós-prandial do glucagon, o GLP-1 suprime. Nos tecidos adiposos, o GIP, mas não o GLP-1, facilita a deposição de gordura. Nos ossos, o GIP promove a formação óssea enquanto o GLP-1 inibe a absorção óssea [SEINO et al., 2010].

Estes peptídeos sofrem, de forma rápida, degradação e inativação pela protease endógena dipeptidil-peptidase 4 (DPP4), o que resulta em meias vidas no plasma muito curtas para as formas ativas de GIP e GLP-1. A microbiota eleva a secreção de incretinas pelo aumento na quantidade/diferenciação de células enteroendócrinas ou produção direta de GLP-1 (fig 3) [GÉRARD, VIDAL, 2019].

Ademais, algumas bactérias são capazes de regular de forma direta a secreção de incretinas através de seus compostos metabólicos produzidos. PICHETTE et al. identificaram que o sulfeto de hidrogênio (H₂S), formado a partir de bactérias redutoras de sulfato na região do cólon, pode estimular diretamente uma resposta intestinal ao GLP-1. A secreção de incretinas é marcadamente prejudicada em indivíduos com obesidade e DM2 em comparação com indivíduos saudáveis [PICHETTE et al., 2017]. Alguns estudos em animais descobriram que a expressão dos receptores GIP (e, em menor grau, GLP-1) nas células beta pancreáticas é (reversivelmente) reduzida durante a hiperglicemia. Assim, a secreção prejudicada parece estar relacionada com uma menor capacidade do GIP em estimular a secreção de insulina devido ao comprometimento das células beta ou a defeitos específicos nas vias de sinalização do GIP [NAUCK, MULLER, 2023].

4.1.1.2. Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)

AGCCs são produzidos na região do cólon e ceco no hospedeiro diante de fermentação anaeróbica de fibras que não são digeridas por bactérias do tipo sacarolíticas [GÉRARD, VIDAL, 2019]. Estes ácidos apresentam diversos benefícios associados à saúde humana e suas propriedades fisiológicas estão relacionadas ao comprimento da cadeia alifática. Eles são classificados em ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), média (AGCM), e longa (AGCL). AGCCs contêm < 6 átomos de carbono, AGCMs de 6 a 12 e AGCLs > 12 átomos [GONZÁLEZ-BOSCH et al., 2021].

Em uma relação mutualística, a partir da alimentação, o hospedeiro fornece fibras não digeríveis que são utilizadas para o crescimento bacteriano e, em

contrapartida, as bactérias geram AGCCs que podem ser usadas por ele [GÉRARD, VIDAL, 2019].

Bactérias presentes na microbiota intestinal, principalmente *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, atuam na metabolização de compostos alimentares, podendo metabolizar carboidratos que não são digeríveis como celulose, hemicelulose, pectina, oligossacarídeos etc em ácidos graxos de cadeia curta tais como os ácidos propiônico, butírico e acético [GOMAA, 2020]. Butirato, propionato e acetato representam 95% dos AGCCs [GÉRARD, VIDAL, 2019]. Acetato, propionato e butirato são produzidos numa proporção de 3:1:1. A maior parte é metabolizada pelos colonócitos enquanto o restante fornece energia para outros órgãos como fígado, músculos, rins, cérebro e coração [LIU et al., 2020].

A fermentação do amido contribui de forma significativa para a produção de butirato no cólon, sendo dominada por *Ruminococcus bromii*. O butirato também é produzido por um número pequeno de microrganismos, sendo eles a *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* e *R. bromii* os maiores responsáveis pelas grandes quantidades de butirato [MORRISON, PRESTON, 2016].

A utilização pelo hospedeiro inclui o uso dos AGCCs como fonte de energia, em muitas vias biológicas, de forma a melhorar a saúde metabólica. Notavelmente, eles afetam a proliferação, diferenciação e inflamação dos colonócitos e também uma ação na melhora do controle glicêmico, melhorando também a sensibilidade à insulina em órgãos periféricos, secreção de incretina, funções pancreáticas e a integridade da parede intestinal (fig. 3) [GÉRARD, VIDAL, 2019].

A descoberta de receptores de AGCCs destacou ainda mais a importância deles como moduladores da interação da microbiota com o hospedeiro em processos metabólicos. Dois receptores acoplados à proteína G (GPR41 e GPR43) [GÉRARD, VIDAL, 2019] foram identificados como os receptores mais importantes de AGCCs. Após as suas descobertas, ambos foram renomeados para receptor 3 de ácidos graxos livres (FFAR3 - *Free fatty acid receptor 3*) e (FFAR2 - *Free fatty acid receptor 2*), respectivamente. Este último é amplamente presente nas células α e β das ilhotas pancreáticas e nas células enteroendócrinas intestinais (células I e L) [HE et al., 2020]. Eles também estão presentes em outros locais, sendo o intestino, sistema nervoso simpático, fígado, tecido adiposo branco, músculo esquelético, pâncreas e tecidos imunes [GÉRARD, VIDAL, 2019].

4.1.1.2.1. AGCCs e homeostase da glicose e disfunção pancreática

A glicose é fosforilada para a produção de ATP, utilizado como fonte de energia, ou de glicogênio, principal reserva energética. A regulação do equilíbrio da glicose no sangue inclui a produção deste açúcar assim como o seu consumo. Os hormônios insulina e glucagon regulam a concentração da glicose no sangue e estudos demonstraram que os AGCCs participam deste processo [HE et al., 2020], contribuindo positivamente para o metabolismo da glicose de modo a normalizar seus níveis plasmáticos bem como a sua tolerância, além de promoverem a oxidação de ácidos graxos o que diminui o armazenamento de gordura e, assim, prevenindo a obesidade [LIU et al., 2020].

Disfunções pancreáticas afetam a homeostase da glicose e são caracterizadas como uma proliferação prejudicada das células beta e também produção e secreção alteradas de insulina e glucagon pelas ilhotas alfa e beta [MANDALIYA, SESHADRI, 2019]. FFAR2 e FFAR3 também estão presentes nas células das ilhotas pancreáticas, indicando que os AGCCs podem agir diretamente nestas células [ØRGAARDA, JEPSEN, HOLST, 2019]. Muitos estudos relataram efeitos benéficos dos AGCCs nas proteínas de fusão mitocondrial como atrofia (OPA1) e mitofusina (MFN) 1 e 2, e proteínas de fissão. Um aumento destas proteínas de fusão protege as mitocôndrias contra a apoptose induzida por toxinas, podendo favorecer a prevenção da disfunção das células β , salvando os em casos de diabetes tipo 1 e tipo 2 [HU et al., 2020].

Estudos demonstraram que a ativação do FFAR3 estimula a secreção do hormônio PYY pelas células enteroendócrinas [HE et al., 2020] (fig 4), um hormônio intestinal que, além de inibir a motilidade do intestino, reduz o apetite [GÉRARD, VIDAL, 2019] e aumenta a absorção de glicose no músculo e tecido adiposo [HE et al., 2020]. O FFAR3 também está relacionado com a liberação de GLP-1 (fig 4) por meio da ação do butirato que estimula a secreção não só a sua secreção, mas também a do GIP por meio de estímulos nas células beta pancreáticas [MANDALIYA, SESHADRI, 2019]. A ativação do receptor GPR41 inibe, ainda, a sinalização de insulina e o acúmulo de gordura [GÉRARD, VIDAL, 2019].

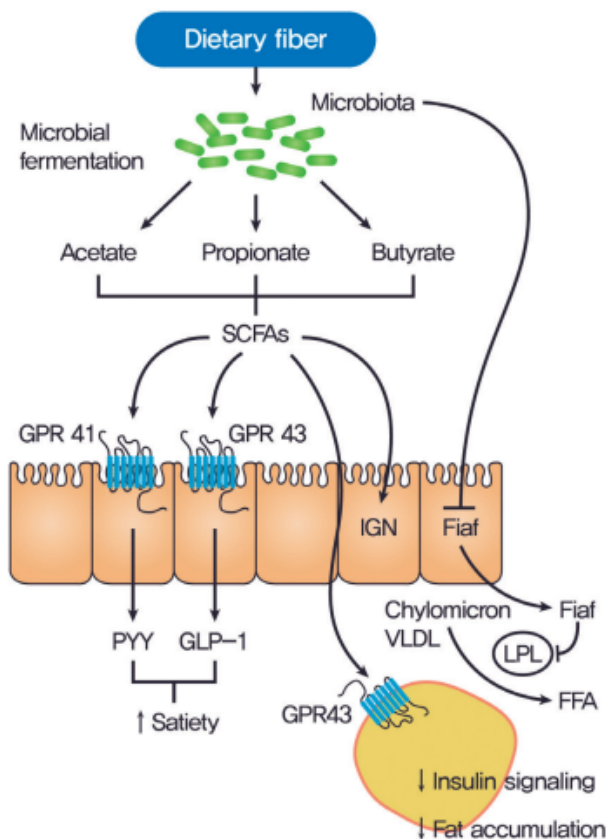
Através do FFAR2, os AGCCs também estimulam a secreção de GLP-1 que, por sua vez, eleva a secreção de insulina e diminui a secreção de glucagon [HE et al., 2020].

AGCCs como o butirato e propionato também ativam a gliconeogênese intestinal (IGN - *Intestinal gluconeogenesis*), o butirato através de um circuito neuronal intestino-cérebro envolvendo GPR41, estimulando a expressão de genes envolvidos na IGN por meio de um mecanismo dependente de cAMP e independentemente de GPR43 (FFAR2), enquanto o propionato, um substrato da IGN, ativa a expressão de genes por meio de um circuito neural intestinal [GÉRARD, VIDAL, 2019].

Estudos mostraram que os AGCCs são capazes de aumentar a expressão do transportador GLUT4 (*Glucose transporter 4*), translocando-o para a membrana celular, promovendo a absorção de glicose pelos mioblastos [HE et al., 2020].

Por fim, a microbiota intestinal é capaz de suprir a expressão do fator adiposo induzido por jejum (Fiaf - *Fasting-induced adipose factor*), produzido por células epiteliais intestinais (IEC - *Intestinal epithelial cell*), que atua como inibidora da lipase lipoproteica (LPL - *Lipoprotein lipase*) (fig. 4) [GÉRARD, VIDAL, 2019]. A inibição da LPL restringe o acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos e conseqüentemente diminui as chances do desenvolvimento de resistência insulínica [DAHIYA et al., 2017] por meio da redução de processos inflamatórios no tecido adiposo que serão abordados ao longo do corpo textual, bem como a sua relação com a sinalização prejudicada de insulina.

Figura 4 – Vias metabólicas afetadas pela microbiota intestinal a partir dos AGCCs



Fonte: [HUR, LEE, 2015].

Os AGCCs, a exemplo do acetato, propionato e butirato, também parecem regular a homeostase da glicose e de lipídios por meio da ativação da AMPK, envolvendo os receptores G. No fígado, o propionato possui ação gliconeogênica, enquanto o acetato e butirato têm ações lipogênicas [MORRISON, PRESTON, 2016].

Por fim, o acetato foi associado com a supressão da lipólise dos adipócitos, reduzindo o fluxo de ácidos graxos livres (AGLs) em direção ao fígado, atenuando a deterioração pelo fígado gorduroso na homeostase da glicose [MORRISON, PRESTON, 2016]. A metformina também reduziu a absorção de ácidos biliares, resultando de forma indireta na melhora da dislipidemia [DEVARAJ et al., 2016] ao estimular um aumento na produção de ácidos graxos a partir do colesterol, diminuindo a quantidade de lipoproteína de baixa densidade (LDL - *Low-density lipoprotein*) em 15 a 26% no sangue [JR, 2006].

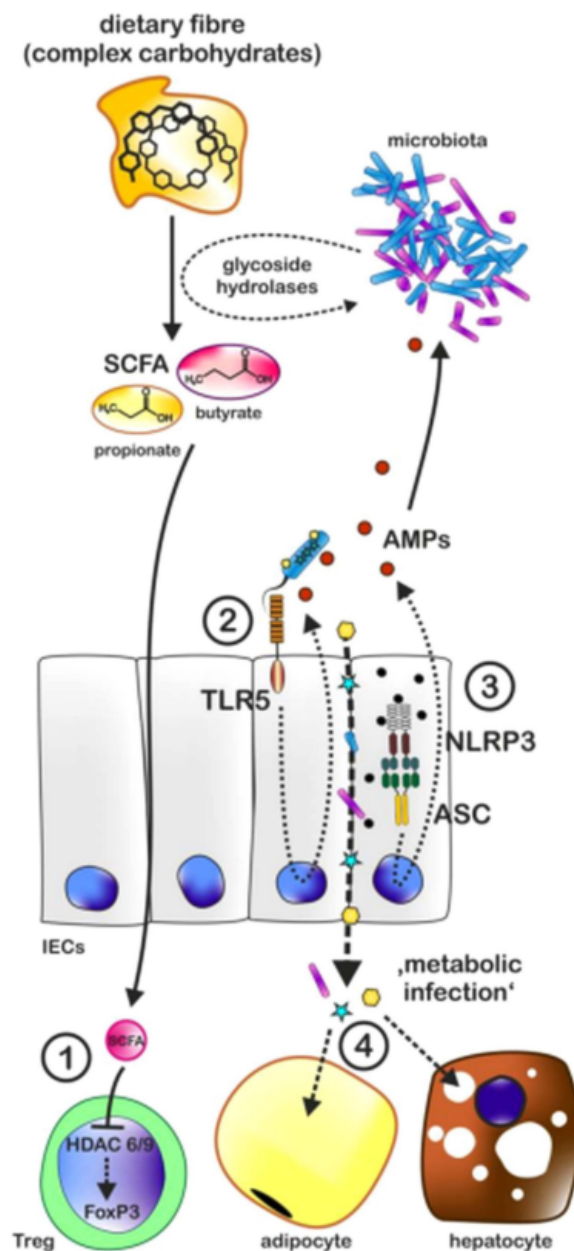
4.1.1.2.2. AGCCs e função imunológica

Outras funções dos AGCCs estão relacionadas com o papel na coordenação do sistema imune e inflamatório. O butirato apresenta potencial regulação imunológica, inibindo a ativação do fator nuclear kappa b (NF-kB - *Nuclear factor kappa B*) em macrófagos e inibição do processo de desacetilação de histonas que desempenham papel na sinalização de vias inflamatórias específicas e de mecanismos epigenéticos. Por meio dessa inibição, o butirato e o propionato também exercem papel na produção e função regulatória de células T (Tregs - *Regulatory T cells*) [GURUNG et al., 2020]. De maneira geral, o butirato atua como um inibidor das histonas desacetilases (HDAC - *Histone Deacetylase*) 6 e 9, promovendo a acetilação da histona H3 e favorecendo a expressão do fator de transcrição FoxP3 específico de Tregs (fig. 5) [TILG, MOSCHEN, 2014].

Residentes no tecido adiposo, as Tregs exercem controle na inflamação local, impedindo a inflamação por parte de macrófagos M1 e células T CD8 +. Estudos em camundongos diabéticos mostraram que o número de Tregs em seus tecidos adiposos, induzidos pela obesidade, é consideravelmente menor do que em camundongos magros [SHIN et al., 2015]. A diminuição da inflamação no tecido adiposo pelas Tregs eleva a tolerância à glicose [HASANI et al., 2021]. Macrófagos M1 produzem citocinas inflamatórias, enquanto macrófagos M2 possuem potencial anti-inflamatório. No tecido adiposo saudável, mais de 90% dos macrófagos são do fenótipo M2 [FUJISAKA, 2021]. Já as células T CD8 + recrutam macrófagos durante o processo de inflamação no tecido adiposo por um mecanismo que permanece não sendo claro [KIRAN et al., 2021].

O desenvolvimento das Tregs na região do cólon o protege contra inflamações por meio da ativação dos receptores GPR43 e foi demonstrado que pacientes com inflamações no cólon apresentam maiores chances de desenvolvimento de diabetes tipo 2 [TILG, MOSCHEN, 2014].

Figura 5 – O *crossstalk* entre a microbiota intestinal e o hospedeiro modula a imunidade da mucosa e a inflamação sistêmica



Fonte: [TILG, MOSCHEN, 2014].

Por fim, os AGCCs demonstraram efeito na inibição da expressão de citocinas induzidas por LPS, IL-6 e IL12p40 em células dendríticas maduras humanas [GURUNG et al., 2020].

4.1.1.2.3. AGCCs e integridade intestinal

É bem estabelecido que os AGCCs são compostos importantes para a manutenção do epitélio do cólon. Por vezes referido como o “paradoxo do butirato”, o butirato parece ter uma dupla função, sendo utilizado como combustível pelas

células do epitélio intestinal, estimulando a proliferação dos colonócitos saudáveis como também a apoptose das células transformadas [GURUNG et al., 2020].

Os AGCCs também regulam a integridade da barreira intestinal por meio das proteínas de junção estreita (TJP - *Tight Junction Proteins*). O butirato parece ser o regulador mais importante destas proteínas, aumentando a expressão de claudina-1, zonula occludens-1 (ZO-1), também conhecida como proteína de junção estreita 1, e redistribuição de ocludina [GURUNG et al., 2020]. Foi revelado também que ele diminui a passagem de LPS pela membrana, inibindo a ativação de macrófagos e a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias [GURUNG et al., 2020].

Um grande número de estudos destacou os efeitos antidiabéticos benéficos da suplementação com AGCCs ou fibras dietéticas, que aumentam a produção ou a colonização bacteriana de produtores destes ácidos [GÉRARD, VIDAL, 2019].

Em 2015, HUR e LEE mostraram que em pacientes com DM2 há uma disbiose em relação a concentração de AGCCs em comparação com indivíduos saudáveis. Pacientes diabéticos exibiram menores quantidades de *Clostridiales* produtores de butirato, a exemplo de *Roseburia intestinalis*, *Subdoligranulum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* and *Ruminococcus* e concentrações mais elevadas de *Clostridiales*, do filo das *Firmicutes*, que não produzem butirato [HUR, LEE, 2015].

4.1.1.3. Metabolismo de ácidos biliares

Os ácidos biliares, surfactantes digestivos, são sintetizados a partir do colesterol pelos hepatócitos por meio do uso de várias reações enzimáticas. Atuando como emulsificantes, eles auxiliam na digestão e absorção de vitaminas lipossolúveis e lipídios [GÉRARD, VIDAL, 2019].

Inicialmente, formam-se os ácidos biliares primários que, posteriormente, são conjugados com glicina e taurina e armazenados na vesícula biliar para serem secretados no lúmen intestinal após a ingestão de alimentos. Apenas cerca de 5% não são reabsorvidos e acabam eliminados nas fezes, o restante é reabsorvido no intestino grosso, em especial por meio da ação de *Firmicutes* [MUÑOZ-GARACH et al., 2016].

Além do papel de surfactantes, desde a última década, surgiram evidências de que os ácidos biliares também atuam como moléculas de sinalização, tendo

papel na sensibilização à insulina, em especial via interação com o receptor nuclear farnesóide (FXR - *Farnesoid X receptor*) e o receptor acoplado à proteína G de membrana (TGR5) [GÉRARD, VIDAL, 2019]. Ambos estão presentes em diversos tecidos como íleo, cólon, vesícula biliar e nos tecidos adiposos branco e marrom [MUÑOZ-GARACH et al., 2016]. A sensibilização também acontece pela liberação do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF-19 - *Fibroblast Growth Factor 19*) [SHIM, YU, 2020].

O receptor farnesóide atua como sensor biliar envolvido na absorção, síntese e secreção de ácidos biliares no fígado. CARIOUL et al. relataram que o FXR pode estar relacionado com o controle do metabolismo da glicose. Quando ativado, ele aumenta a expressão do gene da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK - *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*), uma enzima envolvida no controle da taxa de gliconeogênese. O glucagon e os glicocorticóides, que possuem fortes ações gliconeogênicas, também induzem a PEPCK, enquanto a insulina, que suprime a gliconeogênese hepática, reprime a PEPCK [CARIOUL et al., 2005].

Por meio da ligação com a AMPK, o FXR é reprimido, resultando em uma redução da sua atividade, com conseqüente diminuição da absorção de ácidos biliares. Pelo fato de ativar a AMPK, a metformina pode potencializar efeitos no pool de ácidos biliares via FXR [MCCREIGHT et al., 2016]. O impedimento da reabsorção dos ácidos biliares reduz a quantidade deles na circulação, estimulando o fígado a produzir mais a partir do colesterol [WU et al., 2023].

Através do receptor TGR5, presente nas células L do epitélio intestinal, os ácidos biliares são capazes de estimular a liberação de GLP-1, contribuindo para a homeostase da glicose e no músculo e no tecido adiposo marrom eles aumentam a atividade mitocondrial e fosforilação, o que leva a uma sensibilização à insulina [MUÑOZ-GARACH et al., 2016].

O FGF-19 é um hormônio secretado pelo intestino delgado em resposta à alimentação, tendo ações semelhantes às da insulina, como promover a captação de glicose nos adipócitos, sintetizar glicogênio hepático e inibir a gliconeogênese. Também desempenha um papel na homeostase dos ácidos biliares e no metabolismo das proteínas hepáticas. Níveis mais baixos de FGF19 são observados em pacientes com DM2 e pacientes obesos [SHIM, YU, 2020]. Quando na circulação, o FGF-19 atravessa a corrente sanguínea e se liga a receptores nos hepatócitos para reprimir a síntese de ácidos biliares a partir da inibição da enzima

citocromo P450 7A1 (CYP7A1) que produz ácidos biliares primários a partir de colesterol [WINSTON, THERIOT, 2020].

Estudos indicam uma relação de mutualismo entre os ácidos biliares e a microbiota intestinal. A atividade de várias espécies bacterianas desconjugam, desidrogenam e desidroxilam os ácidos biliares primários para formar ácidos biliares secundários [GÉRARD, VIDAL, 2019], a exemplo do ácido desoxicólico (DCA - *Deoxycholic acid*) e ácido litocólico (LCA - *Lithocholic acid*) [TILG, MOSCHEN, 2014], aumentando assim a diversidade da composição do pool de ácidos biliares [ZHANG, HU, 2020].

Vários estudos têm destacado a importância de genes de modificação de ácidos biliares no microbioma intestinal no metabolismo do hospedeiro, quantificando a abundância de genes hidrolases de sais biliares (BSH - *Bile Salt Hydrolase*), 7 alfa-desidroxilase (ADH - *Alpha-dehydroxylase*) e 7-alfa da hidroxisteróide desidrogenase (HSDH - *Hydroxysteroid dehydrogenase*) em amostras fecais de pacientes com DM2 [GÉRARD, VIDAL, 2019], além de enzimas importantes na produção de ácidos biliares secundários, tais como ácido desoxicólico e ácido litocólico [LABBÉ et al., 2014]. Com base em triagem metagenômica, *Firmicutes* (30%), *Bacteroidetes* (14.4%) e *Actinobacteria* (8,9%) são os três principais filos que possuem BSH [WINSTON, THERIOT, 2020]. Bactérias que possuem BSH, convertem os sais biliares conjugados em mais de 20 metabólitos, a exemplo dos ácidos DCA e LCA [LIMA et al., 2017].

Algumas cepas probióticas de *Lactobacillus*, como *Lactobacillus plantarum* WCFS1 e *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, também contêm genes BSH, revelando a importância dos microrganismos intestinais na desconjugação dos ácidos biliares [WINSTON, THERIOT, 2020]. Os microrganismos intestinais estão também envolvidos na formação dos ácidos biliares secundários bem como importantes para a regulação da síntese deles nos hepatócitos [WINSTON, THERIOT, 2020]. Todavia, pouco se sabe a respeito dos ácidos biliares secundários no que diz respeito à suas funções biológicas, impactos na saúde do hospedeiro e quais microrganismos os produzem [WINSTON, THERIOT, 2020].

Estudos mostraram que a microbiota intestinal dos pacientes com DM2 foi caracterizada por uma redução significativa na BSH derivada de *Firmicutes*. A redução dos genes ADH e HSDH também foi encontrada em pacientes com DM2 em relação a controles saudáveis [GÉRARD, VIDAL, 2019].

4.1.1.4. Inflamação do tecido adiposo e controle da endotoxemia

Um equilíbrio adequado na microbiota intestinal é essencial para apoiar a função de barreira do epitélio intestinal. Por meio da restauração das proteínas de junções estreitas (TJP) e supressão da inflamação intestinal, a microbiota mantém a integridade da barreira. A maior permeabilidade intestinal em pacientes com DM2 leva ao processo da endotoxemia [TORRES et al., 2019].

A endotoxemia é definida pela passagem dos lipopolissacarídeos (LPS) para o sistema circulatório, ocasionando e induzindo uma resposta imune que, por sua vez, interfere na sinalização da insulina, inibindo-a [TILG, MOSCHEN, 2014], além de interferir na obesidade e diabetes [CANI et al., 2006]. Mudanças na microbiota podem estimular e permitir o início de inflamações. Tais processos inflamatórios podem agir “localmente” e posteriormente de forma sistêmica caso a barreira da mucosa esteja prejudicada [TILG, MOSCHEN, 2014] de maneira que o LPS seja capaz de atravessar a membrana em direção ao plasma. Os lipopolissacarídeos estão presentes na composição da parede celular de bactérias gram-negativas e encontram-se em quantidades elevadas no plasma em indivíduos com ingestão aumentada de gordura e em pessoas diabéticas [MUÑOZ-GARACH et al., 2016]. Eles contribuem para a integridade estrutural e proteção contra ataques químicos e o intestino é a principal fonte de LPS. Estima-se que haja mais de 1g desta endotoxina na região intestinal e uma pequena quantidade dela no sistema circulatório é capaz de causar reações inflamatórias [MOREIRA, ALFENAS, 2012], porém o aumento na sua concentração plasmática de também pode ser oriundo de infecções em outras partes do corpo [MOREIRA, ALFENAS, 2012].

Quando no sangue, o LPS é transportado por lipoproteínas e por uma proteína específica, chamada proteína de ligação ao LPS (LBP - *Lipopolysaccharide Binding Protein*). O tecido adiposo, o fígado e o endotélio são os tecidos alvo e a ligação LPS-receptor é mediada pela LBP [MOREIRA, ALFENAS, 2012].

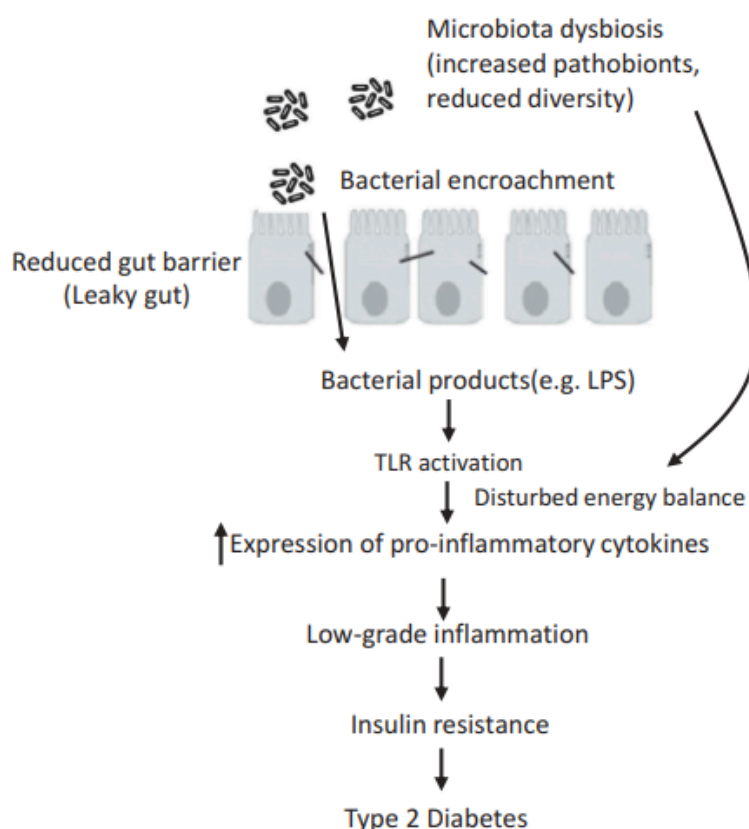
A ligação ao seu receptor TLR4 - *Toll like receptor 4*, nos macrófagos, aumenta a produção de proteínas pró inflamatórias, contribuindo para inflamação de baixo grau, modificando diversos passos da sinalização de insulina [MUÑOZ-GARACH et al., 2016] e contribuindo para a sua resistência (fig. 6) [ADESHIRLARIJANEY, GEWIRTZ, 2020]. A resistência insulínica é caracterizada como uma condição na qual há alterações na cascata de fosforilação da insulina

[MOREIRA, ALFENAS, 2012], favorecendo o ganho de peso e manifestação da DM2.

Os mecanismos que relacionam o processo inflamatório com diabetes ainda não são totalmente claros, mas evidências crescentes indicam que a microbiota intestinal tem um papel no desenvolvimento e manutenção dessa inflamação sistêmica.

Além de regular processos inflamatórios mediados por LPS, a microbiota também rege a inflamação do tecido adiposo por meio da indução do escurecimento do tecido adiposo branco e liberação de GLP-1 (fig. 3) que apresenta efeitos anti-inflamatórios favoráveis aos adipócitos e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo o que, conseqüentemente, contribui para uma melhora na sensibilidade à insulina [GÉRARD, VIDAL, 2019].

Figura 6 - Visão geral de como uma microbiota intestinal disbiótica pode promover diabetes tipo 2.



Fonte: [ADESHIRLARIJANEY, GEWIRTZ, 2020].

O tecido adiposo regula a homeostase energética do corpo. Por muito tempo, o tecido adiposo foi sido descrito como um tecido inerte com função de somente estocar lipídios. Contudo, atualmente, ele é reconhecido como um importante órgão, com funções metabólicas e endócrinas, exercendo um importante papel no metabolismo do hospedeiro, em processos como a regulação glicêmica a partir da ação de microrganismos presentes no intestino humano [GÉRARD, VIDAL, 2019].

No corpo humano, as células do tecido adiposo branco estão em uma maior quantidade e têm como função principal o armazenamento de energia. Em contrapartida, as células do tecido marrom utilizam desta energia para a geração de calor, porém são encontradas em poucos lugares no corpo adulto [MUÑOZ-GARACH et al., 2016].

Em situações de excesso de nutrientes, a exemplo de dietas com elevadas quantidades de gordura (*High Fat Diet - HFD*), os lipídios excedentes são armazenados, e durante esse processo acontece uma expansão da massa adiposa branca, levando a um estresse celular aliado a uma resposta inflamatória local resultado da infiltração de macrófagos e liberação de citocinas pró inflamatórias [GÉRARD, VIDAL, 2019].

O tecido adiposo branco é de grande plasticidade e pode “escurecer”, adquirindo, assim, características do tecido adiposo marrom [GÉRARD, VIDAL, 2019], em um processo conhecido como “escurecimento”, sendo denominadas de células bege. O nome vem em consequência de uma produção aumentada de mitocôndrias [MUÑOZ-GARACH et al., 2016]. Este processo de transição melhora a sensibilidade à insulina, além de promover um fenótipo magro e saudável [GÉRARD, VIDAL, 2019]. No corpo humano, as células do tecido adiposo branco estão em uma maior quantidade e têm como função principal o armazenamento de energia. Em contrapartida, as células do tecido marrom utilizam desta energia para a geração de calor, porém são encontradas em poucos lugares no corpo adulto [MUÑOZ-GARACH et al., 2016].

Em situações como frio ou em momentos da realização de exercícios físicos, as células adipócitas marrons podem aparecer em meio ao tecido adiposo branco [MUÑOZ-GARACH et al., 2016]. Células beges e marrons podem contribuir para o ganho de peso, gasto energético e aumento da tolerância à glicose em roedores e humanos [CZECH, 2020].

Experimentos demonstraram que a diabetes tipo 2 está associada a um excesso na produção de citocinas como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α - *Tumour necrosis factor alpha*), que causam um estado pró inflamatório [MUÑOZ-GARACH et al., 2016]. Descobertas recentes de que o TNF- α é superexpresso no tecido adiposo de camundongos com obesidade revelou uma clara ligação entre obesidade, diabetes e inflamação crônica. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que ativa várias cascatas de transdução de sinal, incluindo muitas vias inibitórias críticas da ação da insulina [HOTAMISLIGIL, 2006]. Pelo fato das citocinas funcionarem em redes, o efeito individual de cada molécula depende do seu lugar na hierarquia na rede, as mais potentes como o TNF- α , exercem efeitos maiores [HOTAMISLIGIL, 2006].

Vários compostos derivados da microbiota intestinal foram descritos por ligarem intestino e regulação da energia do hospedeiro metabolismo através da remodelação do tecido adiposo. Autores concluíram que a abundância relativa de *Firmicutes* está positivamente associada com marcadores de adipócitos marrons no tecido adiposo subcutâneo e sensibilidade à insulina [GÉRARD, VIDAL, 2019]. Níveis elevados de acetato no plasma estimularam a expressão da proteína PRDM16 que demonstrou ser capaz de regular o desenvolvimento de adipócitos marrons. Com base nestas descobertas, outros estudos mostraram que o acetato induz a formação de “adipócitos beges” bem como a atividade da gordura marrom [MORENO-NAVARRETE, FERNANDEZ-REAL, 2019]. Assim como o acetato, e propionato também foi relatado como inibidor da lipólise e estimulador da lipogênese em hepatócitos e adipócitos [MESTDAGH et al., 2012].

Nos tecidos adiposo e hepático, o butirato, propionato o acetato diminuíram a expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-g - *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*), um regulador do armazenamento de ácidos graxos e o metabolismo da glicose, aumentando a oxidação dos ácidos graxos [GURUNG et al., 2020].

Em 2017, Chen et al. identificaram que o uso da cepa probiótica *Lactobacillus reuteri* 263 foi capaz de remodelar o metabolismo do tecido adiposo branco em ratos obesos. Após 8 semanas de tratamento, ela elevou o consumo de oxigênio no tecido branco, além de induzir o escurecimento das células adipócitas brancas por meio da regulação dos genes mRNA relacionados ao escurecimento [CHEN et al., 2018].

4.5. Sinalização inflamatória e ação da insulina

4.5.1. Como os sinais inflamatórios interrompem a ação da insulina e medeiam a resistência à insulina na obesidade?

A insulina é um hormônio produzido pelas células β pancreáticas como resposta aos níveis pós-pancreáticos aumentados de glicose e aminoácidos. Entre seus efeitos, tem-se a regulação da homeostase da glicose, reduzindo a sua produção hepática e aumentando a sua captação periférica, em especial pelos tecidos muscular e adiposo. Ela também estimula a síntese proteica e de lipídios ao mesmo tempo em que inibe a degradação de ambos [MOREIRA, ALFENAS, 2012].

Os receptores de insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1 - *Insulin-like growth factor-1*) fazem parte da família de receptores tirosina quinase, utilizando-se de proteínas para mediar as suas sinalizações. Entre os vários substratos utilizados por eles, tem-se os substratos de receptores de insulina (IRS - *Insulin receptor substrates*) (IRS-1–6). A insulina promove a fosforilação de tirosinas presentes nas proteínas IRS, um evento de extrema importância para a ação deste hormônio [HOTAMISLIGIL, 2006].

Processos inflamatórios são capazes de desencadear a formação de diversas moléculas inflamatórias, a exemplo do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), inibidor de B (IB), quinase β (IKK β) e c-Jun NH₂-quinase terminal (JNK - *c-Jun N-terminal kinase*). Em casos de resistência insulínica, todas estas moléculas podem fosforilar de forma inibitória o IRS transformando-o em serina. Quando isso acontece, a sua fosforilação e formação de tirosina são prejudicados após a estimulação insulínica. A JNK, por exemplo, suprime a fosforilação da tirosina de IRS-1 e IRS-2 [MOREIRA, ALFENAS, 2012].

Em pacientes obesos, há um aumento na expressão de JNK, no tecido adiposo e hepático. A sua ativação é dada após a exposição de citocinas, como o TNF- α , além de ácidos graxos livres [HOTAMISLIGIL, 2006].

O hipotálamo e o músculo esquelético são os primeiros a tornarem-se resistentes, posteriormente as células do fígado e endoteliais. A RI do tecido adiposo acontece mais tarde [MOREIRA, ALFENAS, 2012].

4.6. MICROBIOTA DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS 2 (DM2)

Sabendo agora os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal regula o controle glicêmico, é importante detalhar a microbiota de pacientes saudáveis e com DM2, verificando as diferenças, para assim entender como a metformina pode influenciar nesta disbiose. Pacientes com diabetes apresentam: (1) Aumento na endotoxemia; (2) Modificações na secreção de incretinas relacionadas à resistência à insulina e à funcionalidade das células beta; (3) Modificações na produção de butirato; (4) Mudanças nas características do tecido adiposo marrom; (4) Menor quantidade de ácidos biliares secundários [MUÑOZ-GARACH et al., 2016].

Indivíduos com diabetes tipo 2 têm uma composição alterada da microbiota intestinal [BRYRUP et al., 2019]. A preservação de uma microbiota intestinal normal e saudável desempenha um papel crítico na manutenção da boa saúde. *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, incluindo espécies de *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, e os gêneros *Clostridium*, constituem mais de 90% dos categorias filogenéticas e dominam o intestino saudável microbiota [GÉRARD, VIDAL, 2019].

Em pessoas obesas e diabéticas, pesquisadores encontraram mudanças nas proporções de *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Os níveis mais elevados de Proteobactérias foram associados à pressão oxidativa e inflamação [PITOCCO et al., 2020]. Elas exercem um papel na indução de inflamação de baixo grau em diabéticos através de seus LPS, flagelos e/ou outros componentes de superfície [ADESHIRLARIJANEY, GEWIRTZ, 2020].

Em comparação com pacientes não diabéticos, os diabéticos apresentaram uma diminuição na quantidade de bactérias produtoras de butirato, como *Roseburia intestinalis*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Eubacterium hallii*, menores quantidades de *Verrucomicrobia*, a exemplo da *Akkermansia muciniphila* e aumento de *Lactobacillus gasseri*, *Streptococcus mutans* e alguns *Clostridium* (fig. 7) [MUÑOZ-GARACH et al., 2016]. Além disso, apresentaram maiores quantidades de alguns filos como *Firmicutes* [GOMAA, 2020] e de patógenos oportunistas como *Bacteroides caccae*, vários *Clostridiales*, *Escherichia coli* [PATTERSON et al., 2016], *Eggerthella lenta* que foram relatados anteriormente como causadores de infecções humanas [QIN et al., 2012] e a espécie redutora de sulfato *Desulfovibrio* [PATTERSON et al., 2016].

Figura 7 - Espécies bacterianas relacionadas à ocorrência de resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

	Increased in T2DM	Decreased in T2DM
Bacterial phylum		
<i>Firmicutes</i>	X	
<i>Bacteroidetes</i>		X
Bacterial species		
<i>Roseburia</i>		X
<i>Eubacterium halii</i>		X
<i>Faecalibacterium prauznitzii</i>		X
<i>Lactobacillus gasseri</i>	X	
<i>Streptococcus mutans</i>	X	
<i>Escherichia coli</i>	X	

Fonte: [PITOCCO et al., 2020]

Houve também uma maior quantidade na proporção de *Proteobactérias* e expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios e de estresse oxidativo [MUÑOZ-GARACH et al., 2016].

A microbiota intestinal também contribui em processos inflamatórios relacionados à endotoxemia e resistência à insulina na DM2. Estudos mostraram que, em níveis sanguíneos, certos DNAs bacterianos, sendo 85% derivados do filo *Proteobactérias*, estiveram aumentados em pacientes pré-diabéticos [PATTERSON et al., 2016]. O aumento da permeabilidade intestinal resulta na translocação de produtos microbianos do intestino para o sangue, resultando em endotoxemia metabólica [GURUNG et al., 2020].

Em pessoas saudáveis, o LPS é encontrado no plasma pelo fato de existir bactérias gram negativas na cavidade oral, respiratória e nos órgãos genitais e urinários. Contudo, as quantidades de LPS circulante e LBP são maiores em obesos e pacientes com diabetes 1 e 2. Em diabéticos tipo 2 a concentração chega a ser 76% maior do que indivíduos saudáveis [MOREIRA, ALFENAS, 2012].

O LBP é uma proteína que inicia o reconhecimento do LPS fortalecendo a resposta imune do hospedeiro a este lipopolissacarídeo e pode ser utilizado como um biomarcador de confiança relacionado à resistência à insulina. Ele é bastante encontrado em pessoas intolerantes à glicose [PITOCCO et al., 2020].

O estado diabético em pacientes é caracterizado por um aumento da produção de citocinas como IL-6, IL-1 ou fator de necrose tumoral que afetam negativamente a interação da insulina com seus receptores, contribuindo para um

aumento na resistência à este hormônio [PITOCCO et al., 2020]. Tais citocinas influenciam a expressão e distribuição de proteínas responsáveis de formar junções apertadas, como ocludina e zonula occludens-1, interferindo, por consequência, na permeabilidade e favorecendo a endotoxemia metabólica [MOREIRA, ALFENAS, 2012]. Aliado a este aumento na quantidade de citocinas, pacientes diabéticos têm menores proporções de *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium prausnitzii*, que são gram-positivos com propriedades anti-inflamatórias [PITOCCO et al., 2020].

4.7. AÇÃO DA METFORMINA

4.7.1. A metformina promove o aumento de *Akkermansia muciniphila*

Pertencente ao filo *Verrucomicrobia* e ao gênero *Akkermansia* [ZHANG, HU, 2020], a espécie *Akkermansia muciniphila* é um dos agentes colonizadores do trato intestinal. Correspondendo de 3 a 5% da comunidade bacteriana em adultos saudáveis, ela é uma bactéria degradadora de mucina, uma glicoproteína cuja responsabilidade é a proteção da mucosa contra agentes infecciosos [SILVA et al., 2021]. Caracterizada como gram negativa e anaeróbia, a sua escassez leva a distúrbios clínicos e a sua colonização inicia desde a infância, permanecendo em quantidades semelhantes na fase adulta, porém reduzida em idosos (80-82) [HASANI et al., 2021] e depende de vários fatores relacionados ao hospedeiro a exemplo de síndromes metabólicas (por exemplo, diabetes e obesidade).

A *A. muciniphila* ajuda na proteção da integridade do epitélio intestinal utilizando se, em processos fermentativos, de proteínas glicosiladas da camada de muco epitelial como principal fonte de carbono e nitrogênio. Ácidos graxos de cadeia curta como acetato e propionato são produzidos durante esse processo [SOBCZAK et al., 2019] sendo posteriormente utilizados como fonte de energia pelas células epiteliais do intestino, contribuindo para a integridade da barreira da mucosa [GOMAA, 2020]. O papel na manutenção da integridade da camada de mucina diminui a passagem de lipopolissacarídeos pró inflamatórios pela barreira intestinal [[DE LA CUESTA-ZULUAGA et al., 2017]. Ela também pode influenciar na regulação da expressão de proteínas de junções estreitas como ZO-1, ZO-2, ZO-3, claudinas e ocludina, elevando a quantidade de células caliciformes e restaurando a espessura

do muco da camada interna, através de receptores canabinóides-1 e -2 (CB1 - *Cannabinoid receptor 1* e CB2 - *Cannabinoid receptor 2*) [HASANI et al., 2021].

Outros estudos demonstraram que a *A. muciniphila* possivelmente eleva a produção de endocanabinóides, reduzindo a inflamação e promovendo a secreção de GLP-1 [FORETZ et al., 2019], através do aumento na produção de lipídios bioativos específicos pertencentes a família de endocanabinóides. Estes compostos regulam a produção endógena de peptídeos intestinais envolvidos na barreira intestinal e regulação da glicose [HASANI et al., 2021].

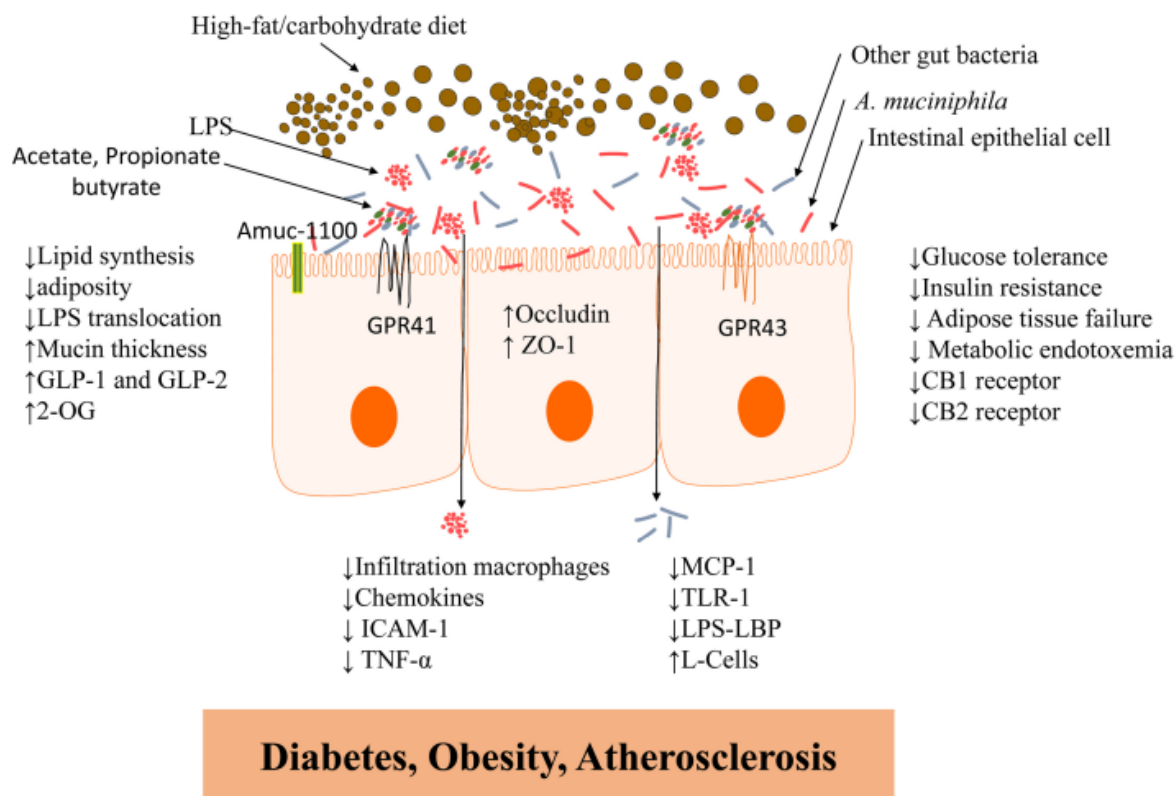
Além disso, quando administrada de forma oral, houve um aumento de células caliciformes e também uma redução no deslocamento de LPS por meio da barreira intestinal, fatores estes que podem atenuar a intolerância à glicose [HASANI et al., 2021].

Outros estudos também sugerem que a *A. muciniphila* exerce funções na gestão do armazenamento de gordura, metabolismo de glicose e inflamação do tecido adiposo. [PATTERSON et al., 2016]. No que diz relacionado à diabetes e obesidade, o seu papel através da regulação do metabolismo de glicose e lipídios foi elucidado a partir da descoberta de que a fermentação da mucina pela *Akkermansia muciniphila* induz a produção de acetato e propionato que ativam os receptores GPR43 e GPR41, receptores acoplados à proteína G expressos em células mononucleares do sangue, do tecido adiposo e epiteliais do cólon [HASANI et al., 2021]. A ligação entre os AGCCs e tais receptores leva à liberação de alguns hormônios peptídicos como o PYY na circulação sistêmica, servindo como uma maneira de comunicação entre o hospedeiro e o intestino [HUR, LEE, 2015]. A secreção dos hormônios GLP-1 e GLP-2 (*Glucagon-like Peptide-2*) pelas células intestinais L também é estimulada pela *Akkermansia* a partir do aumento de 2-oxogluturato (2-OG), utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA - *Tricarboxylic acid*), ou também conhecido como Ciclo de Krebs (fig. 8) [HASANI et al., 2021].

Em pacientes com DM2, estudos demonstraram que a quantidade de *A. muciniphila* é menor. O aumento na abundância de *A. muciniphila* em decorrência do uso de metformina se deve ao fato de que ela atua em células caliciformes que são produtoras de mucina do intestino, favorecendo a produção de muco o que contribui para o crescimento da bactéria [FORETZ et al., 2019]. A metformina multiplica a quantidade de células caliciformes, de forma independente da dieta [KYRIACHENKO et al., 2019] e estudos acreditam que ela regula a diferenciação de

células tronco intestinais (ISCs - *Intestinal Stem Cells*) em células caliciformes [LEE et al., 2021].

Figura 8 - O papel de *A. muciniphila* no diabetes, obesidade e aterosclerose



Fonte: [HASANI et al., 2021].

A. muciniphila também contribuiu para a proliferação de outras bactérias através de interações tróficas, a exemplo da *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Lactobacillus*. A atividade da *A. muciniphila* produz enzimas degradadoras de mucina como proteases e sulfatases, oligossacarídeos e AGCCs, incluindo o acetato. Todos estes produtos podem ser utilizados pelos membros da comunidade para a suas próprias proliferações [XU et al., 2020].

Em relação à regulação do armazenamento de gordura, estudos reportaram que a *A. muciniphila* atenua inflamações no tecido adiposo em virtude do aumento de gordura. O aumento dos níveis de endocanabinóides induz a secreção de peptídeos intestinais como o GLP-1 que estimula a secreção de insulina, suprime o glucagon e retarda o esvaziamento gástrico, contribuindo para a perda de gordura em virtude da redução da ingestão de alimentos [SILVA et al., 2021]. A atenuação

também acontece pela regulação das Tregs e FoxP3 (células T reguladoras naturais) no tecido adiposo visceral [HASANI et al., 2021].

Devido aos seus vários benefícios, a *Akkermansia muciniphila* tem sido considerada como candidata promissora a ser utilizada como bioterapêutico vivo [BARBOSA et al., 2022]. Bioterapêuticos podem ser definidos como “produtos de terapia medicamentosa em que a substância ativa é extraída ou produzida a partir de uma fonte biológica [JOHNSON, 2018].

4.7.2. A metformina promove bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)

Aliado a uma menor capacidade de produção de AGCCs, pacientes não tratados com metformina tiveram um aumento na quantidade de genes microbianos relacionados com a degradação de glicina e triptofano, bem como redução nos genes envolvidos na treonina e arginina. Tal fato é de importante relevância uma vez que a glicina tem sido relacionada com sensibilidade à insulina [VALLIANOU et al., 2019] e é utilizada no processo de conjugação com os ácidos biliares primários. Todavia, a menor capacidade da microbiota em produzir ácidos graxos, como butirato e propionato, é acentuada em pacientes tratados com metformina [ZHANG, HU, 2020].

Além de influenciar na concentração das bactérias citadas nos tópicos anteriores, o tratamento com metformina elevou a abundância de outras bactérias produtoras de AGCCs, tais como *Allobaculum*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Butyricoccus*, *Lactobacillus*, *Phascolarctobacterium*, *Butyricimonas*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Shewanella*, *Butyrivibrio* [RODRIGUEZ et al., 2018], *Coprococcus* e *Ruminococcus* [ZHANG, HU, 2020].

4.7.3. A metformina regula a renovação dos ácidos biliares

Por meio da regulação dos ácidos biliares, a metformina é capaz de beneficiar o metabolismo da glicose [ZHANG, HU, 2020]. Estudos mostraram que o fármaco exerce um controle na capacidade da microbiota em modificar o pool de ácidos biliares ao atenuar a quantidade de *Bacteroides fragilis* e sua ação de hidrolisar sais biliares em pacientes com DM2 [FORETZ et al., 2019]. A redução da *B. fragilis*,

elevou os níveis do ácido biliar glicoursodesoxicólico (GUDCA), pois a ação redutora da bactéria foi diminuída. O GUDCA, um ácido biliar conjugado, sofre desconjugação pela microbiota intestinal [TILG, MOSCHEN, 2014] e foi identificado como um potencial antagonista do receptor FXR em humanos [FORETZ et al., 2019].

São necessários mais trabalhos para verificar e esclarecer o mecanismo de ação da metformina em relação ao GUDCA e também se a sua utilização pode servir para o tratamento da DM2 [GREENHILL, 2019].

Além disso, houve também aumento na concentração, após o tratamento com metformina, de *Lactobacillus sanfranciscensis*, pertencente ao gênero *Lactobacillus*, que tem a capacidade de interferir na sinalização intestinal do FXR [TILG, MOSCHEN, 2014].

Há evidências de que a inibição do FXR estimula a secreção de GLP-1. Análises em camundongos deficientes de FXR mostraram que os animais apresentaram uma melhora no metabolismo da glicose pelo aumento na secreção de GLP-1. Todavia, o mecanismo pelo qual a regulação acontece, via circulação de ácidos biliares, ainda não é totalmente esclarecido [MCCREIGHT et al., 2016].

Outra ação da metformina foi na redução de ácidos biliares na região do íleo distal, o que aumentou a quantidade de sais biliares no cólon e no íleo por meio do efeito inibitório na reabsorção de ácidos biliares no íleo [ZHANG, HU, 2020]. A supressão da reabsorção acontece por meio da inibição do transportador apical de ácidos biliares dependentes de sódio no íleo [FORETZ et al., 2019]. A inibição da reabsorção, deixa os ácidos mais expostos no intestino e esta exposição prolongada permite que eles se liguem ao FXR intestinal [TILG, MOSCHEN, 2014]. Aliado a isso, houve também aumento na secreção de GLP-1, que acontece através de estímulos aos receptores acoplados à proteína G como o TGR5 presente nas células L dos enterócitos em resposta à biodisponibilidade do pool de ácidos biliares intestinais [FORETZ et al., 2019].

Embora seja complexa e não totalmente compreendida, a homeostase dos ácidos biliares é uma peça no quebra-cabeça que liga a microbiota e o controle glicêmico do hospedeiro. Modulação do eixo microbiota intestinal-bile pode oferecer uma futura abordagem terapêutica na obesidade e T2DM [GÉRARD, VIDAL, 2019].

A metformina também foi capaz de elevar as concentrações de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, esta última possuindo elevada atividade BSH em comparação a outros grupos bacterianos [KIM et al., 2004].

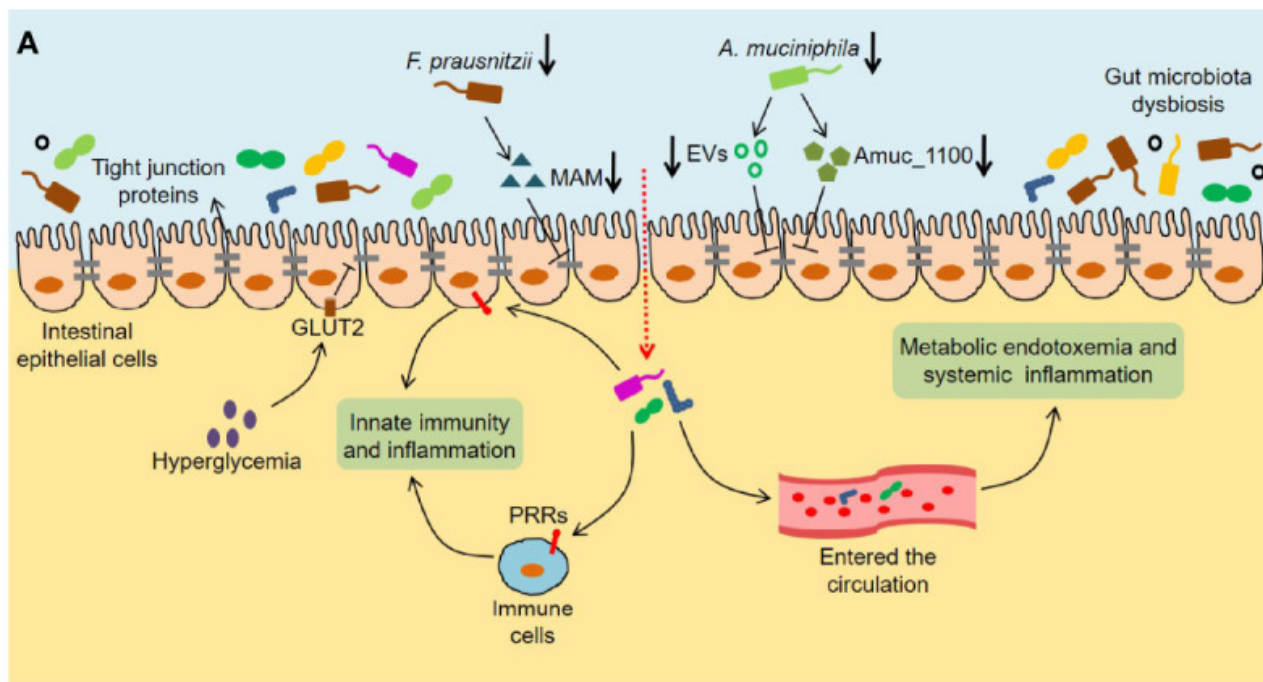
4.7.4. A metformina mantém a integridade da barreira intestinal

Conforme explicado anteriormente, a endotoxemia metabólica é um fenômeno onde a permeabilidade intestinal é afetada, em casos de distúrbios metabólicos, por exemplo, com a translocação de LPS pela barreira do intestino, aumentando a sua concentração plasmática [GÉRARD, VIDAL, 2019] e induzindo uma inflamação crônica que causa resistência à insulina [LEE et al., 2021].

Assim como a *Akkermansia muciniphila*, a *F. prausnitzii* e *Lactobacillus* também exercem importantes atuações na preservação da barreira intestinal devido ao aumento na quantidade de proteínas de junções estreitas das células epiteliais, fortalecendo a barreira intestinal [PATTERSON et al., 2016], além de possuírem efeitos anti-inflamatórios [KE et al., 2021]. A *F. prausnitzii* também produz a molécula anti inflamatória microbiana (MAM - *Microbial anti-inflammatory molecule*), um metabólito capaz de restaurar a barreira intestinal danificada pela expressão positiva de ZO-1. (fig. 9) [ZHOU et al., 2022].

A hiperglicemia interfere nas junções estreitas e aderentes do transportador de glicose 2 (GLUT2 - *Glucose transporter 2*). As vesículas extracelulares (EVs - *Extracellular vesicles*) e a proteína Amuc 1100, ambas derivadas da membrana externa de *A. muciniphila*, mantêm a integridade da barreira intestinal pela ligação com o receptor toll-like 2 (TLR2 - *Toll like receptor 2*), reduzindo a obesidade e a resistência à insulina (fig 9) [ZHOU et al., 2022]. As EVs possuem biomoléculas que induzem a expressão do receptor ativado por proliferadores peroxissomais tipo alfa (PPAR- α - *Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha*) que regula a expressão de genes envolvidos na beta-oxidação de ácidos graxos e é um importante regulador da homeostase energética [VAN RAALTE, 2004]. Tanto as EVs como a proteína Amuc_1100 são reduzidas em diabéticos [ZHOU et al., 2022].

Figura 9 - Respostas imunológicas e inflamatórias induzidas pela microbiota intestinal no DM2



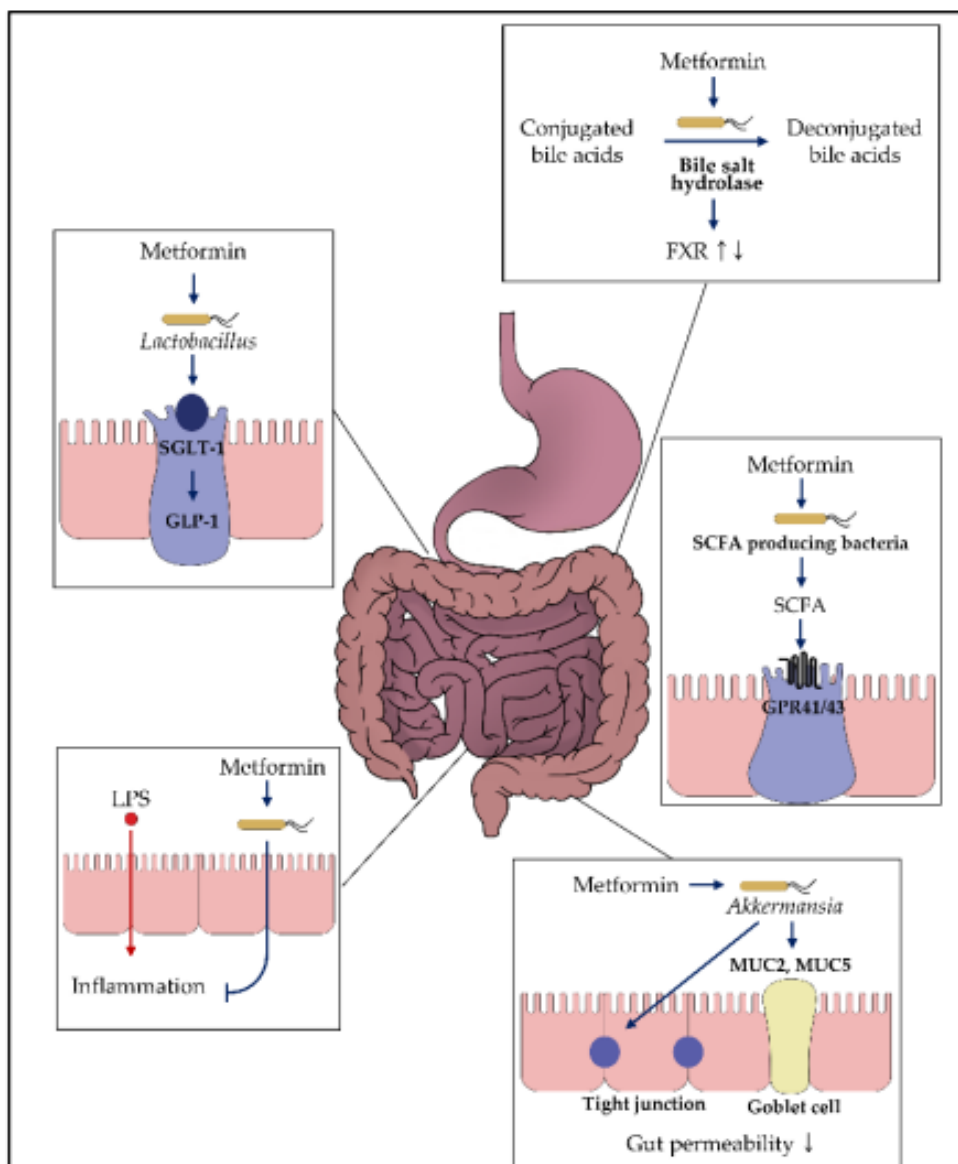
Fonte: [ZHOU et al., 2022]

O tratamento com metformina também elevou a expressão de mucina2 (MUC2), uma proteína que cobre o epitélio intestinal, ao expandir o número de células caliciformes que a secretam [KE et al., 2021].

A expressão do gene MUC5 também foi aumentada em camundongos e com isso, muitas proteínas de junção como ocludinas e ZO-1 foram recuperadas e a permeabilidade intestinal foi reduzida (fig 10) [LEE et al., 2021].

Não somente isso, mas níveis da *Bifidobacterium spp* também foram aumentadas, uma bactéria gram negativa que apresenta propriedades anti-inflamatórias. O aumento na sua concentração, estimula a liberação de GLP-1 que contribui para a diminuição da permeabilidade intestinal [PITOCCO et al., 2020].

Figura 10 - Impacto da metformina na microbiota intestinal



Fonte: [RODRIGUEZ et al., 2018].

4.7.5. A metformina aumenta a secreção de peptídeos relacionados ao intestino

Foi demonstrado que o tratamento com metformina elevou as concentrações de GLP-1 em estudos conduzidos em humanos e animais, estimulando a secreção pelas células L e/ou diminuindo a sua degradação pelo DPP4, porém com um impacto pequeno na atividade do DPP4 e um maior na secreção de GLP-1. Estudos demonstraram que o fármaco eleva as expressões de pré-proglucagon e

proglucagon no intestino grosso, duas proteínas precursoras do GLP-1, aumentando, assim, a produção do mesmo [MCCREIGHT et al., 2016].

Um efeito semelhante aconteceu com os níveis do PYY durante o uso de metformina, porém os efeitos foram menos pronunciados do que os observados com o GLP-1. Além disso, houve correlações entre a abundância dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* com a concentração de PYY, indicando uma possível associação entre estas bactérias e a regulação deste hormônio [RODRIGUEZ et al., 2018].

Um outro possível mecanismo é a regulação indireta da secreção de GLP-1 da metformina por meio de alterações no pool de ácidos biliares através da modulação da microbiota intestinal. Estas novas descobertas apoiam a hipótese de que a metformina regula os hormônios GLP-1, PYY e GIP, envolvidos na secreção da insulina e também nos efeitos de redução da glicose. Ela é capaz de diminuir as concentrações de GIP e estimular positivamente o GLP-1 e PYY [RODRIGUEZ et al., 2018].

O intestino delgado superior é responsável por desencadear sinais de feedback negativo a partir de peptídeos oriundos da ingestão de nutrientes, um deles é a liberação do GLP-1 via cotransportador de sódio-glicose-1. A este respeito, a metformina elevou a secreção de GLP-1 e a expressão de SGLT-1 (fig. 10). A regulação positiva de metabólitos mediados SGLT-1 produzidos por *Lactobacillus* resultou no aumento da captação de glicose após o tratamento com metformina. A espécie *Lactobacillus gasseri* aumentou a expressão do transportador de glicose 4 (GLUT-4) no músculo com potencial efeito antidiabético [GURUNG et al., 2020], sugerindo que os *Lactobacillus* podem estar associados com a modulação da glicose. Além disso, houve também um aumento na expressão do gene GPR120, conhecido por afetar a expressão do GLP-1. No entanto, o mecanismo pelo qual a metformina altera a abundância de *Lactobacillus* permanece desconhecido [LEE et al., 2021].

4.7.6. A metformina modula a resposta imune

A metformina também é capaz de inibir a liberação direta de citocinas inflamatórias como as interleucinas 6 (IL-6), 1 β (IL-1 β) e o TNF- α . SHIN et al também demonstraram aumento na quantidade de células T regulatórias durante

tratamento, podendo se traçar uma correlação negativa entre marcadores inflamatórios e o tratamento com metformina [SHIN et al., 2014].

A abundância de *Bacteroides* e *Butyricimonas* também aumentou, correlacionado negativamente com a expressão de IL-1 β e IL-6, sendo esta última possuindo efeitos pró inflamatórias, reduzindo a sinalização de insulina no tecido adiposo [LEE et al., 2021].

Um resultado foi semelhante com o aumento de bactérias do gênero *Lactobacillus* e várias espécies de *Lactobacillus* que demonstraram modular a inflamação após o tratamento [LEE et al., 2021]. Muitas espécies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei*), são capazes de reduzir quantidades de IL-1 β e IL-8. Foi demonstrado também que *Lactobacillus gasseri* reduz a obesidade, aumentando os genes de oxidação de ácidos graxos e reduzindo os genes relacionados à síntese de ácidos graxos [GURUNG et al., 2020].

A produção de butirato por *Faecalibacterium* e *Roseburia* é conhecida por inibir a atividade do fator nuclear kappa B (NF- κ B) [LEE et al., 2021] que está envolvido na transcrição de macrófagos M1 e na indução de um grande número de genes inflamatórios [LIU et al., 2017]. *R. intestinalis* também pode aumentar a produção de IL-22, uma citocina anti inflamatória conhecida por restaurar a sensibilidade à insulina [GURUNG et al., 2020].

5. CONCLUSÃO

Com o passar dos anos, a microbiota intestinal tem atraído cada vez mais interesse pelo fato de estar envolvida em diversos efeitos relacionados ao controle glicêmico e a relação entre DM2, metformina e microbiota intestinal está gradualmente compreendida. Está bem estabelecido o desequilíbrio intestinal em pacientes diabéticos e o seu comprometimento em relação ao controle glicêmico. Embora, não há um consenso a respeito de todas as bactérias que são afetadas pela metformina, a grande maioria dos estudos mostrou a diminuição no número de bactérias produtoras de ácidos graxos livres em pacientes diabéticos e também revelaram a forte relação entre a microbiota intestinal e os efeitos redutores de glicose da metformina. Mecanicamente, os AGCCs, especialmente o butirato e o propionato, evoluíram como caminhos atraentes pelo fato de poderem moldar as funções imunológicas e metabólicas da microbiota. Vários outros mecanismos

estabelecem uma relação entre as bactérias intestinais e a homeostase da glicose: secreção de incretinas, metabolismo de ácidos biliares e regulação da integridade da barreira intestinal e do tecido adiposo, sugerindo que estas vias podem ser utilizadas como caminhos promissores para o tratamento de distúrbios glicêmicos. As possibilidades atuais de modificar esta microbiota para nosso próprio benefício são numerosas e oferecem resultados esperançosos.

Apesar das ações na microbiota, ainda não está claro quanto dos efeitos hipoglicemiantes da metformina vêm destas alterações, mas os mecanismos clássicos de ação, a exemplo da inibição da gliconeogênese no fígado, mantêm a importância no tratamento em diabéticos. Devido a composição e riqueza da microbiota serem modulados pela dieta, saúde do hospedeiro, idade, etnia, genética etc, há uma dificuldade na comparação entre estudos e futuros estudos ainda são necessários para esclarecer em mais detalhes alguns mecanismos pelos quais a metformina influencia no metabolismo da glicose e todas as bactérias que compõem a microbiota intestinal.

A respeito do uso de outros tratamentos, *Lactobacillus* e *Akkermansia* interferem em várias vias de atuação da metformina e são fortes candidatos a serem utilizados como probiótico e bioterapêutico respectivamente, em especial a *Akkermansia muciniphila* que está implicada na melhoria de distúrbios metabólicos, como endotoxemia metabólica, adiposidade, resistência à insulina e inflamação de baixo grau.

6. REFERÊNCIAS

VALLIANOU, NATALIA G.; STRATIGOU, T. & TSAGARAKIS, S. Metformin and gut microbiota: their interactions and their impact on diabetes. **Hormones**, v. 18, p. 141-144, 2019.

HASANI, A.; EBRAHIMZADEH, S.; HEMMATI, F.; KHABBAZ, A.; HASANI, A. & GHOLIZADEH, P. The role of *Akkermansia muciniphila* in obesity, diabetes and atherosclerosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.70, 2021.

XU, Y.; WANG, N.; TAN, H-Y.; LI, S.; ZHANG, C.; & FENG, Y. Function of *Akkermansia muciniphila* in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. **Frontiers in Microbiology**, v.11, 2020.

MUÑOZ-GARACH, A. M.; DIAZ-PERDIGONES, C. D.; TINAHONES, F. J. Microbiota y diabetes mellitus tipo 2. **Endocrinología y Nutrición**, v. 63, p. 560-568, 2016.

SILVA, P. H.; FREITAS, L. de B. R. de.; SANTOS, S. M. dos; CARMO, T. L. do; PORTO, A. L. F.; OLIVEIRA, V. de M.; CALAÇA, P. R. de A.; SOARES, M. T. C. V. Agente intestinal bacteriano com potencial biotecnológico frente às desordens metabólicas: Uma revisão integrativa sobre a *Akkermansia muciniphila*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, 2021.

CUESTA-ZULUAGA, J. DE LA.; MUELLER, N. T.; CORRALES-AGUDELO, V.; VELÁSQUEZ-MEJÍA, E. P.; CARMONA, J. A.; ABAD, J. M.; ESCOBAR, J. S. Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading *Akkermansia muciniphila* and Several Short-Chain Fatty Acid–Producing Microbiota in the Gut. **Diabetes Care**, v. 40, p. 54-62, 2017.

KE, H.; LI, F.; DENG, W.; LI, Z.; WANG, S.; LV P.; CHEN Y. Metformin Exerts Anti-inflammatory and Mucus Barrier Protective Effects by Enriching *Akkermansia muciniphila* in Mice With Ulcerative Colitis. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, 2021.

LEE, H.; KO, G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 19, p. 5935–5943, 2014.

HU, S.; KUWABARA, R.; DE HAAN, B.J.; SMINK, A.M.; DE VOS, P. Acetate and Butyrate Improve β -cell Metabolism and Mitochondrial Respiration under Oxidative Stress. **International Journal Molecular Sciences**, v. 21, 2020.

PAN, X.; RAAIJMAKERS, J.; CARRIÓN, V. J. Importance of Bacteroidetes in host-microbe interactions and ecosystem functioning. **Trends in Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 959-971, 2023.

SOBCZAK, A. I. S.; BLINDAUER, C. A.; & STEWART, A. J. Changes in Plasma Free Fatty Acids Associated with Type-2 Diabetes. **Nutrients**, v. 11, n. 9, 2019.

BINDA, C.; LOPETUSO, L. R.; RIZZATTI, G.; GIBIINO, G.; CENNAMO, V.; GASBARRINI, A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. **Digestive and Liver Disease**, v. 50, n. 5, p. 421-428, 2018.

JANDHYALA, S. M.; TALUKDAR, R.; SUBRAMANYAM, C.; VUYYURU, H.; SASIKALA, M.; REDDY, N. D. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787-803, 2015.

PATTERSON E.; RYAN, P. M.; CRYAN, J. F.; DINAN, T. G.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Gut microbiota, obesity and diabetes. **Postgrad Med J**, v. 96, p. 286–300, 2016.

GURUNG, M.; LI, Z.; YOU, H.; RODRIGUES, R.; JUMP. D. B.; MORGUN, A.; SHULZHENKO, N. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. **EBioMedicine**, v. 51, 2020.

MOREIRA, A. P. B. & ALFENAS, R. de C. G. The influence of endotoxemia on the molecular mechanisms of insulin resistance. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, p. 382-390, 2012.

CARIOUL et al. Farnesoid X Receptor: A New Player in Glucose Metabolism?. **Endocrinology**, v. 146, p. 981–983, 2005.

GÉRARD, C.; VIDAL, HUBERT. Impact of Gut Microbiota on Host Glycemic Control. **Sec. Molecular and Structural Endocrinology**, v. 10, 2019.

PITOCCO, D.; DI LEO, M.; TARTAGLIONE, L.; DE LEVA, F.; PETRUZZIELLO, C.; SAVIANO, A.; PONTECORVI, A.; OJETTI, V. The role of gut microbiota in mediating obesity and diabetes mellitus. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, p. 1548-1562, 2020.

GREENHILL, C. Effects of metformin mediated by gut microbiota. **Nature Reviews I Endocrinology**, v. 15, 2019.

BRYRUP, T.; THOMSEN, C. W.; KERN, T.; ALLIN, K. H.; BRANDSLUND, I.; JORGENSEN, N. R.; VESTERGAARD, H.; HANSEN, T.; HANSEN, T. H.; PEDERSEN, O.; NIELSEN, T. Metformin-induced changes of the gut microbiota in healthy young men: results of a non-blinded, one-armed intervention study. **Diabetologia**, v. 62, p. 1024-1035, 2019.

CZECH, M. P. Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes. **Molecular Metabolism**, v. 34, p. 27-42, 2020.

LIU, T., ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S.C. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2017.

MORENO-NAVARRETE, J. M.; FERNANDEZ-REAL, J. M. The gut microbiota modulates both browning of white adipose tissue and the activity of brown adipose tissue. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 20, p. 387–397, 2019.

PICHETTE, J.; FYNN-SACKEY, N.; GAGNON, J. Hydrogen sulfide and sulfate prebiotic stimulates the secretion of GLP-1 and improves glycemia in male mice. **Endocrinology**, v. 158, n. 10, p. 3416–3425, 2017.

SHIN, N. R.; WHON, T. W.; BAE, J. W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-50, 2015.

GOMAA, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. **Epub** , v. 113, p. 2019–2040, 2020.

ZHOU, Z.; SUN, B.; YU, D.; ZHU, C. Gut Microbiota: An Important Player in Type 2 Diabetes Mellitus. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 28, 2022.

ZHANG, Q.; HU, N. Effects of Metformin on the Gut Microbiota in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p. 5003–5014, 2020.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. **Gut**, v. 63, p. 1513-1521, 2014.

LEE, C. B.; CHAE, S. U.; JO, S. J.; JERNG, U. M.; BAE, S. K. The Relationship between the Gut Microbiome and Metformin as a Key for Treating Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal Molecular Sciences**, 2021.

ADESHIRLARIJANEY, A.; GEWIRTZ, A. T. Considering gut microbiota in treatment of type 2 diabetes mellitus. **Gut Microbes**, v. 11, n. 3, p. 253-264, 2020.

FORETZ, M.; GUIGAS, B.; VIOLLET, B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews I Endocrinology**, v. 15, p. 569-589, 2019.

SANCHEZ-RANGEL, E.; INZUCCHI, S.E. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 60, p. 1586–1593, 2017.

TORRES, S.; FABERSANI, E.; MARQUEZ, A.; GAUFFIN-CANO, P. Adipose tissue inflammation and metabolic syndrome: The proactive role of probiotics. **European Journal of Nutrition**, v. 58, p. 27–43, 2019.

MCCREIGHT, L. J.; BAILEY, C. J.; PEARSON, E. R. Metformin and the gastrointestinal tract. **Diabetologia**, v. 59, p. 426–435, 2016.

HUR, K. Y.; LEE, M. S. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 39, p. 198-203, 2015.

QIN, J.; LI, Y.; CAI, Z. ET AL. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, p. 55–60, 2012.

MINAMII, T.; NOGAMI, M.; & OGAWA, W. Mechanisms of metformin action: In and out of the gut. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 9, n. 4, p. 701-703, 2018.

KYRIACHENKO, Y.; FALALYEYEVA, T.; KOROTKYI, O.; MOLOCHEK, N.; KOBLYIAK, N. Crosstalk between gut microbiota and antidiabetic drug action. **World Journal of Diabetes**, v. 10, n. p. 154-168, 2019.

DEVARAJ, S.; VENKATACHALAM, A.; & CHEN, X. Metformin and the Gut Microbiome in Diabetes. **Clinical Chemistry**, p. 1554-1555, 2016.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nature Reviews I Endocrinology**, v. 10, p. 143–156, 2014.

SHIM, J. & YU, R. Gut Hormones in Pregnancy and Lactation. **Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology**, p. 91-99, 2020.

SHIN, N.R.; LEE, J.C.; LEE, H.Y.; KIM, M.S.; WHON, T.W.; LEE, M.S.; BAE, J.W. An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. **Gut**, v. 63, p. 727-735, 2014.

LABBÉ, A.; GANOPOLSKY, J. G.; MARTONI, C. J.; PRAKASH, S.; JONES, M. L. Bacterial bile metabolising gene abundance in Crohn's, ulcerative colitis and type 2 diabetes metagenomes. **PLOS One**, 2014.

LEE, H.; KO, G. Effect of Metformin on Metabolic Improvement and Gut Microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 19, p. 5935-5943, 2014.

MONTANDON, S. A.; JORNAYVAZ, F .R. Effects of Antidiabetic Drugs on Gut Microbiota Composition. **Genes**, v. 8, 2017.

HOTAMISLIGIL, G. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p. 860–867, 2006.

WINSTON, J. A.; & THERIOT, C. M. Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota. **Gut Microbes**, v. 11, n. 2, p. 158-171, 2020.

CHEN, L.H.; CHEN, Y.H.; CHENG, K.C.; CHIEN, T.Y.; CHAN, C.H.; TSAO, S.P. & HUANG, H.Y. Antiobesity effect of *Lactobacillus reuteri* 263 associated with energy metabolism remodeling of white adipose tissue in high-energy-diet-fed rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p.87-94, 2018.

RODRIGUEZ, J.; HIEL, S.; & DELZENNE, N. M. Metformin: old friend, new ways of action—implication of the gut microbiome?. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 21, n. 4, p. 294-301, 2018.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189–200, 2016.

GONZÁLEZ-BOSCH, C.; BOORMAN, E.; ZUNSZAIN, P. A.; MANN, G. E. Short-chain fatty acids as modulators of redox signaling in health and disease. **Redox Biology**, v.47, 2021.

KERNER, W.; BRÜCKEL, J. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **German Diabetes Association: Clinical Practice Guidelines**, p. 384–386, 2014.

GALICIA-GARCIA, U.; BENITO-VICENTE, A.; JEBARI, S.; LARREA-SEBAL, A.; SIDDIQI, H.; URIBE, K. B.; OSTOLAZA, H.; MARTÍN, C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal Molecular Sciences**, v. 21, 2020.

KIM, G.B.; MIYAMOTO, C. M.; MEIGHEN, E. A.; LEE, B. H. Cloning and Characterization of the Bile Salt Hydrolase Genes (bsh) from *Bifidobacterium bifidum* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5603–5612, 2004.

CANI, P. D.; KNAUF, C.; IGLESIAS, M. A.; DRUCKER, D. J.; DELZENNE, N. M.; BURCELIN, R. Improvement of Glucose Tolerance and Hepatic Insulin Sensitivity by Oligofructose Requires a Functional Glucagon-Like Peptide 1 Receptor. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1484–1490, 2006.

What are the gut microbiota and human microbiome?. **Medical News Today**, 2022. Disponível em <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/307998>>.

LIMA, A. J de O.; FREITAS, A. C. de M.; HEIBEL, A. B.; PIMENTEL, G.; PINTO, L. G. P. N.; DOS REIS, S. M. F. A. Microbiota intestinal e doença gordurosa hepática. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, e. 72, 2017.

NCBI Taxonomy to include phylum rank in taxonomic names, **NCBI INSIGHTS**, 2022. Disponível em <<https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/2021/12/10/ncbi-taxonomy-prokaryote-phyla-added/>>.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, p.506-514, 2014.

JR, W. I. Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. **South Med J**, v. 99, n. 3p. 257-73, 2006.

SEINO, Y.; FUKUSHIMA, M.; YABE, D. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. **Journal of Diabetes Investigation**, v.1, n. 1, 2010.

VAN RAALTE, D. H.; LI, M.; PRITCHARD, P. H.; WASAN, K. M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1531-1538, 2004.

FUJISAKA, S. The role of adipose tissue M1/M2 macrophages in type 2 diabetes mellitus. **Diabetology International**, v. 12, p. 74-79, 2021.

KIRAN, S.; KUMAR, V.; MURPHY, E. A.; ENOS, R. T.; SINGH, U. P. High Fat Diet-Induced CD8⁺ T Cells in Adipose Tissue Mediate Macrophages to Sustain Low-Grade Chronic Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

WU, J.; YANG, K.; FAN, H.; WEI, M. & XIONG, Q. Targeting the gut microbiota and its metabolites for type 2 diabetes mellitus. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, 2023.

NAUCK, M. A.; MULLER, T. D. Incretin hormones and type 2 diabetes Michael A. **Diabetologia**, v. 66 p. 1780–1795, 2023.

RIZZATTI, G.; LOPETUSO, L. R.; BINDA, G. C. & GASBARRINI, A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. **BioMed Research International** , v. 2017, 2017.

HE, J.; ZHANG, P.; SHEN, L.; NIU, L.; TAN, Y.; CHEN, L.; ZHAO, Y.; BAI, L.; HAO, X.; LI, X.; ZHANG, S. & ZHU, L. Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signaling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. **International Journal Molecular Sciences**, 2020.

LIU, J. L.; SEGOVIA, I.; YUAN, X. Y. & GAO, Z. H. Controversial Roles of Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) on Pancreatic β -Cell Growth and Insulin Secretion. **International Journal Molecular Sciences**, 2020.

MANDALIYA, D. K. & SESHADRI, S. Short Chain Fatty Acids, pancreatic dysfunction and type 2 diabetes. **Pancreatology**, v.19, p. 280-284, 2019.

ØRGAARDA, A.; JEPSEM, S; L & HOLST, J. J. Short-chain fatty acids and regulation of pancreatic endocrine secretion in mice. **Islets**, v. 11, n. 5, p. 103-111, 2019.

CORCORAN, C. & JACOBS, T. F. Metformin. **StatPearls**, 2023.

FORETZ, M.; GUIGAS, B. & VIOLLET, B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. **Nature Reviews Endocrinology** , v. 19, p. 460-476, 2023.

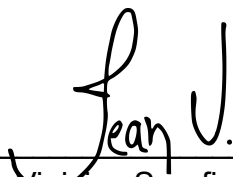
LAMOIA, T. E. & SHULMAN, G. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. **Endocrine Reviews**, v. 42, n. 1, p. 77-96, 202.

DE LA CUESTA-ZULUAGA, J.; MUELLER, N. T.; CORRALES-AGUDELO, V.; VELÁSQUEZ-MEJÍA, E. P. & CARMONA, J. A. Metformin is associated with higher relative abundance of mucin-degrading Akkermansia muciniphila and several short-chain fatty acid-producing microbiota in the gut. **Diabetes Care**, v. 40, p. 54-62, 2017.

BARBOSA, J. C.; ALMEIDA, D.; MACHADO, D.; SOUSA, S.; FREITAS, A. C.; ANDRADE, J. C.; GOMES, A. M. Spray-drying encapsulation of the live biotherapeutic candidate Akkermansia muciniphila DSM 22959 to survive aerobic storage. **Pharmaceuticals**, v. 15, p. 1-13, 2022.

JOHNSON, D. E. Biotherapeutics: Challenges and Opportunities for Predictive Toxicology of Monoclonal Antibodies. **International Journal Molecular Sciences**, v. 19, 2018.

São Paulo, 18 de Outubro de 2023.



Jean Vinicius Serafim da Silva



Carla Taddei de Castro Neves