

DIABETIS AVUI



RELLEVÀNCIA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN DIABETIS MELLITUS TIPUS 2

José María Moreno Navarrete

CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN)

Departament de Medicina, **Universitat de Girona (UdG)**

Departament de Diabetis, Endocrinologia i Nutrició

Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI)

Parc Hospitalari Martí i Julià, C/ Dr. Castany s/n (17190, Salt - Girona)



872 98 70 87 (ext 71)



jmoreno@idibgi.org

Resum

En els darrers quinze anys la microbiota intestinal ha estat en el focus d'un ampli ventall d'estudis clínics sobre els trastorns metabòlics associats amb la obesitat i la diabetis tipus 2. D'aquests estudis, que combinen recerca experimental en models animals i dades observacionals, transversals i longitudinals, sobre la microbiota fecal humana, s'extreu que hi ha una significativa alteració en la estructura de la microbiota i del microbioma intestinal i en els metabòlits d'origen bacterià en subjectes amb una baixa sensibilitat a la insulina i en pacients diabètics. L'alteració en els metabòlits d'origen bacterià descrita en pacients diabètics es manifesta amb la reducció d'àcids grassos de cadena curta i amb l'increment de productes derivats de la fermentació proteica i patrons moleculars associats a patògens. En aquesta revisió es repasarán els estudis més rellevants que relacionen la microbiota intestinal i el risc de diabetis, amb l'objectiu d'elucidar el possible rol de la microbiota en la fisiopatologia de la diabetis. També es revisarà l'eficiència de diverses aproximacions terapèutiques vigents per tal de prevenir i tractar la diabetis a través de la microbiota.

Introducció

La prevalença mundial d'obesitat, el seus trastorns metabòlics i la diabetis tipus 2 (DM2) s'ha incrementat de forma exponencial en els últims 30 anys. L'obesitat produeix un balanç energètic positiu crònic, on el teixit adipós excedeix la seva capacitat per emmagatzemar l'excés d'energia. En conseqüència un flux de lípids accedeix a la circulació, i es produeix l'acumulació ectòpica de greix en teixits no adiposos, com el fetge i la musculatura esquelètica. En paral·lel amb aquest procés hi ha un increment en la producció de citocines inflamatòries que porten a un estat d'inflamació subclínica que, juntament amb l'acumulació ectòpica de greix, contribueixen significativament al desenvolupament de la resistència perifèrica i hepàtica a la insulina, i el desenvolupament de DM2. Els darrers 15 anys el microbioma intestinal ha estat catalogat com un important regulador del metabolisme energètic de l'hoste. Alteracions en la composició de la microbiota intestinal o en la seva funcionalitat podrien afectar la fisiopatologia de la obesitat i la diabetis. El microbioma intestinal humà conté entre 500 i 1.000 espècies bacterianes que expressen aproximadament 2.000.000 de gens i superen en 100 vegades els gens humans. L'intestí prim es colonitza amb per una baixa abundància de microorganismes anaeròbics facultatius, amb una densitat microbiana aproximada de 100 microorganismes per gram de teixit, mentre que el cec i colon s'arriba a una densitat de més de 1,000 microorganismes per

gram de teixit ^(I). La composició i l'abundància microbiana depenen de factors endògens com el pH, la motilitat, la mucosa intestinal i els pèptids antimicrobians, i de factors externs com són el consum de medicaments i la dieta ^(I). Els aliments no digeribles però fermentables tenen una gran importància modelant la composició de la microbiota intestinal. En dietes occidentals, on la fibra alimentària no és gaire abundant, durant la part final de la digestió els carbohidrats fermentables s'esgoten a la part distal del colon, i això porta els microorganismes a activar la fermentació proteolítica. Per tant, el tipus de fermentació que es produeix a cada regió del colon vindrà definida per l'abundància de fibra alimentària i la composició microbiana ^(I).

El microbioma comprèn la càrrega genètica de la microbiota intestinal i es troba molt més influenciat per factors ambientals com la dieta, el consum de fàrmacs i l'estil de vida, i per mesures antropomètriques, que per factors genètics de l'hoste ^(II). La informació del microbioma pot predir de manera acurada molts trets humans, com paràmetres metabòlics, incloent el pes corporal i la glucèmia basal ^(II). La microbiota humana està formada per aproximadament 250 espècies bacterianes de les quals 57 són compartits per tots els individus, constituint el nucli bacterià comú de la espècie humana. En aquest article revisarem el possible rol de la microbiota en la progressió de la diabetis i diferents aproximacions terapèutiques que s'estan investigant per intentar curar la DM2 a través de la modulació de la microbiota intestinal.

Composició microbiana intestinal en DM2

El primer estudi investigant les diferències entre microbiota intestinal humana en funció de la DM2 va ser dut a terme per Larsen i col·laboradors l'any 2010 ^(III). Realitzant anàlisis de components principals, aquests autors identificarien diferències significatives a nivell de fílum bacterià entre individus sans control i pacients amb DM2. Posteriorment, altres estudis han descrit alteracions en la microbiota de pacients amb DM2 independents de l'índex de massa corporal. Tot i que no hi havia consens a l'hora de descriure quines bactèries es trobaven alterades en pacients amb DM2, una observació comuna en tots aquests estudis ha estat la reducció de l'abundància de bactèries productores de butirat en DM2 ^(III-V). Foslund i col·laboradors varen intentar discernir quins canvis en la microbiota eren produïts per la DM2 i quins per la medicació associada, majoritàriament metformina ^(VI). En aquest estudi van trobar que una gran part de les discrepàncies apreciades en estudis anteriors podrien ser explicades pel tractament amb metformina. En línia amb estudis previs ^(IV,V), els pacients amb DM2 sense tractament amb metformina tenien menys bactèries productores de butirat, en comparació amb subjectes control. De la mateixa manera, l'augment

descriu prèviament en DM2 per espècies de *Lactobacillus* i la *Akkermansia muciniphila* resultaria, precisament, del tractament amb metformina. Un estudi danès recent integrava dades de resistència a la insulina, microbioma intestinal i nivells basals de metabòlits en el sèrum de 277 individus sense diabetis per investigar si el microbioma intestinal impacta en les signatures metabòliques associades a resistència a la insulina ^(VII). Aquests autors trobaven que el metaboloma del sèrum d'individus resistents a la insulina indica una elevada capacitat per la biosíntesis d'aminoàcids de cadena ramificada, però una baixa eficiència en la transmissió d'aquests compostos cap a les cèl·lules bacterianes i la seva catàlisi ^(VII). Semblaria que els majors productors d'aminoàcids de cadena ramificada eren les espècies bacterianes *Prevotella copri* i *Bacteroides vulgatus*. Aquest estudi suggereix que la microbiota intestinal podria ser una important font que explicaria l'increment d'aminoàcids de cadena ramificada associat a resistència a la insulina ^(VII,VIII).

A més dels estudis que s'han comentat i que comparaven la microbiota de pacients diabètics amb subjectes sans, altres treballs han estudiat la microbiota intestinal durant la progressió de la tolerància alterada a la glucosa i l'estadi de prediabetis ^(IX,X). Similar al que passa en diabètics, en prediabetis també hi ha una reducció significativa de les soques de l'ordre de *Clostridiales* i *Akkermansia muciniphila*. Per *Faecalibacterium prausnitzii*, un important productor del butirat que trobem reduït en DM2, trobaven una soca reduïda però una altra incrementada en individus prediabètics ^(IX). En aquest estudi la transferència de microbiota de pacients prediabètics en ratolins convencionals alimentats amb una dieta diabetogènica (i.e. rica en àcids grassos i sacarosa) no té cap efecte en el metabolisme de la glucosa, indicant que, possiblement, els canvis produïts en la microbiota en l'estat de prediabetis no són suficients per alterar la tolerància a la glucosa ^(IX). Un estudi anterior també demostrava reduccions de *Akkermansia muciniphila* i *Faecalibacterium prausnitzii* en subjectes prediabètics ^(X), tot recolzant el rol d'aquestes espècies bacterianes com a marcadors de risc de DM2.

Akkermansia muciniphila

Amb fins un 5% del total de les bactèries intestinals, la *Akkermansia muciniphila* és una de les espècies individuals més abundants de la microbiota intestinal humana. Aïllada pel professor Willem de Vos el 2004, i caracteritzada com un microorganisme especialista en la degradació de mucines ^(XI), la *A. Muciniphila* és actualment percebuda com un microbi beneficiós i indicador, en termes generals, d'un bon estat de salut ^(XII,XIII). Una reducció significativa d'*A. Muciniphila* ha estat identificada en la microbiota intestinal de ratolins obesos i diabètics. Sistemàticament, l'abundància d'*A. Muciniphila* és inversa al pes

corporal, la massa grassa, la inflamació, la resistència a la insulina i la intolerància a la glucosa (^{XIV-XVII}). En humans, l'abundància relativa d'*A. Muciniphila* també es trobava reduïda en condicions preferentment patològiques com l'obesitat, la DM2, la hipertensió, la hipercolesterolèmia i la malaltia hepàtica (^{IV,X,XVIII,XIX}). És d'interès que tant la metformina, que és el tractament antidiabètic més emprat, com la cirurgia bariàtrica, que també resol de manera molt eficient i ràpida la DM2 en pacients obesos, produeixen un increment molt significatiu d'*A. Muciniphila* (^{VI,XX}).

A més d'aquests estudis, abundants però majorment observacionals, l'impacte *in vivo* de l'administració d'*A. Muciniphila* en diversos models experimentals ha estat també investigat (^{XIV,XXI-XXIII}). Gràcies a aquests estudis s'accepta que l'administració d'*A. Muciniphila* protegeix contra trastorns metabòlics associats a l'obesitat. Tots els estudis en que els animals eren tractats amb *A. Muciniphila* demostraven que la bactèria reduïa el pes corporal, frenava el guany de massa grassa, la esteatosi hepàtica, la inflamació, els nivells de colesterol i el desenvolupament d'aterosclerosi; que millorava la sensibilitat a la insulina i restaurava la funció de la barrera intestinal, influenciant diferents factors com el gruix de la mucosa intestinal, l'expressió de les proteïnes d'unió, els pèptids antimicrobians i la immunitat (^{XIV,XXI-XXIII}). Potencialment, un dels mecanismes d'acció de l'*A. Muciniphila* seria la proteïna extracel·lular Amuc_1100 (^{XXI}). Es tracta d'una proteïna de la membrana externa de la bactèria que sembla jugar un rol immunomodulador (^{XXI}). Aquest efecte immunomodulador podria explicar per què aquest bacteri pot endarrerir l'aparició de diabetis tipus 1 en animals propensos a desenvolupar la malaltia (^{XXIII}). L'Amuc_1100 estimula la producció de les interleucines IL1 β , IL6, IL8, IL10 i la citoquina TNF α en cèl·lules mononuclears de la sang perifèrica a través del TLR2 (^{XXIV}). L'*A. Muciniphila* pot suportar el creixement de productors de butirat degradant mucina i subministrant acetat. Addicionalment, l'*A. Muciniphila* produeix sulfatases i podria ser capaç d'utilitzar el sulfur (H₂S) per la producció de cisteïna. Com a resultat, limitaria la possible toxicitat de les bactèries productores de sulfur (^{XXIV, XXV}). En relació amb la immunitat, l'impacte de l'*A. Muciniphila* sembla ser de gran importància també en el context de teràpia contra el càncer (^{XXVI-XXVIII}). Prèviament s'ha demostrat que l'èxit de les teràpies anticàncer depèn en gran mesura de la microbiota intestinal (^{XXVI}). Específicament, en estudis més recents s'ha demostrat que la microbiota intestinal i l'expressió de gens bacterians específics podria influir en el resultat de la immunoteràpia contra el càncer com el tractament anti-PD-1 (^{XXVII,XXVIII}). Primerament, els autors "observen" que els pacients que responen al tractament anti-PD-1 són aquells que exhibien una major abundància relativa de l'*A. Muciniphila* intestinal, en comparació amb els que no responien tan bé.

Quan els autors passaren a l'estratègia del concepte demostrat per proves fefaents, transferint en ratolins microbiota de pacients "sensibles" (els que responien) i pacients "resistents" (els que no responien), confirmaren que els ratolins que rebien microbiota dels pacients "resistents" també tenien una resposta alterada al tractament, que era revertida i/o corregida quan s'administrava *A. Muciniphila* ^(^{XXVII,XXVIII}).

Faecalibacterium prausnitzii

El *Faecalibacterium prausnitzii* és una de les espècies bacterianes més abundants en l'intestí humà, i representa un 2-15% del total de la càrrega bacteriana ^(^{XXIX,XXX}). Es tracta d'un anaerobi extremadament sensible a l'oxigen. El *F. prausnitzii* promou la salut intestinal per diverses vies ^(^{XXXI,XXXII}), com són:

- i) Alimentar els colonòcits amb el subministrament de butirat
- ii) Mantenir l'homeòstasis immune gràcies també al butirat que inhibeix la via NFκB i promou l'activitat transcripcional de PPARγ, reduint la inflamació ^(^{XXXI})
- iii) Enfortir la integritat de la mucosa intestinal

El *F. prausnitzii* també tindria en models *in vitro* una acció antiinflamatòria, en monòcits i en cèl·lules d'epiteli intestinal, bloquejant l'activació de la via NFκB. A més del butirat, el *F. prausnitzii* produeix una proteïna antiinflamatòria denominada "microbial anti-inflammatory molecule" (MAM), amb capacitat inhibidora de NFκB tant *in vitro* com *in vivo*. El restabliment amb prebiòtics de *F. prausnitzii* en intestins inflamats millora considerablement la salut intestinal ^(^{XXXI,XXXII}). El caràcter anaeròbic d'aquest bacteri fa difícil la seva producció a gran escala, de cares a un possible us terapèutic.

Metabòlits microbians i DM2

La microbiota intestinal facilita, directa o indirectament, diverses funcions vitals per l'hoste, incloent-hi la digestió, l'obtenció de l'energia de carbohidrats no digeribles però fermentables i la síntesis de certes vitamines. També participa en la formació de cèl·lules immunitàries. Molts dels metabòlits que produeixen les bacteries a través de la fermentació de carbohidrats complexos com els àcids grassos de cadena curta modulen vies de senyalització involucrades en el manteniment de la salut ^(¹). La fermentació d'hidrats de carboni no digeribles (a.k.a. fibra alimentaria) es denomina fermentació sacarolítica i produeix àcids grassos de cadena curta com l'acetat, el butirat, el propionat i altres metabòlits, com l'etanol, el lactat i el succinat, així com gasos (e.g. H₂, metà i CO₂). Aquesta fermentació es dona a la part proximal del colon, i estudis en animals

suggereixen que aquests àcids grassos de cadena curta tenen un rol important en la prevenció i el tractament de la resistència a la insulina associada amb l'obesitat. Observacions en humans confirmen aquest efecte beneficiós. Per altra banda, la microbiota distal del colon utilitza principalment pèptids residuals i proteïnes per obtenir energia, a través de la fermentació proteica. Utilitzen els pèptids i proteïnes com a substrat energètic perquè la fibra alimentària ja s'ha consumit a la part més proximal del colon. Com a conseqüència de la fermentació proteolítica es produeixen una gran diversitat de metabòlits, com compostos fenòlics, indols, sulfur d'hidrogen i aminoàcids, i àcids grassos de cadena ramificada (e.g. isobutirat i 2-metilbutirat), molts dels quals poden ser perjudicials per la integritat intestinal i la salut metabòlica. Altres metabòlits microbians, com la dimetilamina, la trimetilamina, el lipopolisacàrid i els àcids biliars secundaris també contribuirien en l'aparició de trastorns metabòlics, però sembla que no depenen directament d'aquests processos fermentatius.

L'**acetat** ($C_2H_3O_2^-$) és l'àcid gras de cadena curta més abundant a nivell sistèmic, essent els seus nivells en sèrum de entre 5 i 200 $\mu\text{mol/l}$. El propionat ($\leq 13 \mu\text{mol/l}$) i el butirat ($\leq 12 \mu\text{mol/l}$) es troben en menor concentració. L'alliberació més significativa d'àcids grassos de cadena curta de l'intestí al torrent sanguini ha estat vinculada amb la regió distal del colon. A la regió proximal els àcids grassos de cadena curta són transportats via vena portal cap al fetge. El butirat i el propionat són metabolitzats al fetge, mentre que l'acetat es captat en un percentatge menor i assoleix altes concentracions en circulació sistèmica. Pel contrari, els àcids grassos de cadena curta absorbits a la regió distal del colon passen a través del plexe pèlvic, que drena a la vena cava inferior i la circulació sistèmica de forma més directa. Això implica que una major quantitat dels metabòlits microbians arribaran a òrgans perifèrics si s'administren o es produeixen en la regió distal del colon. Els àcids grassos de cadena curta tenen l'habilitat d'estimular la producció d'hormones que regulen la sacietat, com serien el pèptid YY (PYY) i el "glucagon-like peptide 1" (GLP-1) en cèl·lules enteroendocrines, a través de receptors acoblats a proteïna G, GPR41 i GPR43, també coneguts com FFAR3 i FFAR2, respectivament. Per exemple, en estudis en humans s'ha demostrat que l'administració de sodi acetat via rectal incrementa les concentracions circulants de PYY en subjectes amb sobrepès (^{xxxiii}). Aquests metabòlits poden estimular també la secreció de leptina en adipòcits. De fet, les injeccions intraperitoneals d'acetat, propionat i butirat inhibeixen la ingesta en ratolins a través d'un mecanisme relacionat amb la estimulació vagal aferent (^{xxxiv}). Tot i això, la possibilitat d'una estimulació directa sobre les neurones vagals aferents, induïda per àcids grassos de cadena curta i actuant sobre l'homeòstasis energètica requereix més recerca.

Un elegant estudi demostrava també en ratolins que el propionat ($C_2H_5CO_2^-$) i el butirat ($C_4H_7O_2^-$) contribueixen a la prevenció d'obesitat i resistència a la insulina a través de la inducció de gluconeogènesis intestinal^(xxxv). Mentre el butirat induïx la gluconeogènesis intestinal en enteròcits, el propionat activa GPR41 en el sistema neural periportal aferent per induir aquest procés. L'augment de gluconeogènesis intestinal produïa una reducció en la gluconeogènesis hepàtica i millorava l'homeòstasis energètica^(xxxv). Una primera evidència sobre l'efecte central dels àcids grassos de cadena curta seria aquest estudi recent on demostren que l'administració via colon de propionat redueix l'activitat en el caudat i el nucli accumbens, dues regions cerebrals implicades en la ingesta, quan els participants veien menjar rics en calories. Aquest efecte central es relacionava directament amb una reducció en la ingesta^(xxxvi).

Els àcids grassos de cadena curta també afecten al pes corporal a través de la modulació de la despesa energètica. Per exemple, l'administració oral de butirat en ratolins obesos en redueix el pes corporal a través de la despesa energètica i l'oxidació lipídica^(xxxvii). Altres estudis també demostren que l'administració d'acetat i altres àcids grassos de cadena curta incrementa la termogènesis del teixit adipós blanc, activant processos associats a la producció de calor i l'oxidació lipídica^(xxxviii). Tot i l'abundància d'aquestes troballes en ratolins, la contribució a la termogènesis en el teixit adipós, el control de pes i la homeòstasis energètica encara no està clara en humans. És prou interessant que les dades d'estudis *in vivo* en humans demostrin que les infusions d'acetat, butirat i propionat en la part distal del colon incrementen l'oxidació de lípids i la despesa energètica basal en subjectes amb sobrepès o obesos^(xxxiii,xxxix). Un darrer estudi publicat l'any 2018 demostrava que l'administració oral de propionat també incrementa la despesa energètica i els processos oxidatius en homes normopès^(xl). A teixits com la musculatura esquelètica l'acetat i el butirat incrementen també la capacitat oxidativa i el consum de greix, reduint la deposició de lípids intramusculars, un important inductor de resistència a la insulina^(xxxvii). Un aspecte negatiu d'aquests estudis és que no indaguen en el mecanisme molecular. Estudis addicionals serien necessaris per investigar si les millores en el metabolisme oxidatiu induïts pels àcids grassos de cadena curta es tradueixen en beneficis a llarg termini derivats del control del pes corporal.

Els àcids grassos de cadena curta poden modificar també la funció de la cèl·lula β pancreàtica i la secreció d'insulina. La cèl·lula β expressa els receptors GPR41 i GPR43^(xli,xlii). L'anul·lació de GPR43 en ratolins alimentats amb una dieta obesogènica s'associava al deteriorament de la funció de la

cèl·lula β i un increment en la massa pancreàtica de cèl·lula β (^{XLII}). A més a més, la senyalització àcid gras de cadena curta/GPR41 sembla ser important en el control de la secreció de insulina en estadis de dejú prolongat i durant events post-prandials, alterant el control de glucèmia sense afectar la sensibilitat a la insulina (^{XLIII}). En humans, el propionat també ha demostrat efectes beneficiosos en la funció de la cèl·lula β , potenciant la secreció d'insulina en resposta a glucosa i el manteniment de la massa pancreàtica a través de la inhibició de l'apoptosi (^{XLIV}).

Recentment s'ha descrit el rol del succinat en la homeòstasis energètica (^{XLV}). El **succinat** ($C_4H_6O_4$) es un intermediari de la síntesis microbiana de propionat. En ratolins, la concentració cecal de succinat incrementa després de l'administració de fructoligosacàrids. Igual que amb el propionat, aquest augment agut de succinat al cec resulta en l'activació de la gluconeogènesis intestinal (^{XLV}). Tanmateix, veure si l'efecte del succinat es pot traslladar a les persones requereix més investigació. En contraposició a aquestes troballes, un estudi anterior demostrava com una dieta rica en greixos redueix els àcids grassos de cadena curta, principalment del butirat, i n'incrementa els nivells de succinat, en paral·lel al guany de pes i l'augment del greix hepàtic, el colesterol i els triglicèrids plasmàtics (^{XLVI}). L'administració de fibra alimentària reverteix els efectes negatius d'aquest tipus de dieta, n'incrementa els àcids grassos de cadena curta i normalitza els nivells de succinat circulants i els paràmetres metabòlics (^{XLVI}). Un altre estudi demostra que tant en ratolins com en humans els nivells de succinat estan significativament incrementats en associació amb la hiperglucèmia i el diagnosi de diabetis, i que aquest té un impacte inflamatori sobre el teixit adipós al interaccionar amb el seu receptor, cosa que contribueix als trastorns metabòlics associats amb l'obesitat (^{XLVII}). En línia amb això, individus amb un ampli ventall de IMC mostraven un increment en l'abundància relativa de bacteries productores de succinat, una disminució de bacteries consumidores de succinat, i alts nivells circulants de succinat en pacients obesos i/o amb la tolerància a la glucosa alterada (^{XLVIII}). La pèrdua de pes induïda per una dieta hipocalòrica redueix l'abundància relativa de bacteries relacionades amb el metabolisme del succinat, en correlació directa amb els nivells circulants d'aquesta molècula (^{XLVIII}). Malgrat tot això, quedaria per determinar si el succinat representa un metabòlit derivat de la microbiota que contribueix als trastorns metabòlics associats amb l'obesitat, o si simplement l'augment de succinat circulant es conseqüència d'una alteració en la microbiota intestinal associada amb l'obesitat i l'increment en la permeabilitat intestinal.

El sulfur d'hidrogen (H_2S) es un dels productes majoritaris de la fermentació proteolítica. Estudis recents suggereixen que l'excés de H_2S afecta la funció pancreàtica, contribuint al desenvolupament de DM2 ^(XLIX,L). El H_2S estimula la gluconeogènesis i redueix tant el consum de glucosa com la síntesis i l'emmagatzematge de glicogen en hepatòcits, indicant alteracions en l'homeòstasi de la glucosa ^(L). Per altra banda, els pacients amb DM2 tenen reduïts nivells de H_2S al plasma, en comparació amb subjectes sans ^(LII). També en ratolins es demostrava que el H_2S té un rol protector sobre les cèl·lules β i que podria prevenir l'aparició de DM2 ^(LIII). Caldrien més estudis en humans per elucidar el possible rol del H_2S en la fisiopatologia de la DM2.

Un altre metabòlit de la fermentació proteolítica és el p-cresol (C_7H_8O), que es converteix en p-cresil sulfat per acció de les enzimes presents a l'hoste. L'administració de p-cresil sulfat durant 4 setmanes incrementa l'acumulació de greix ectòpic al fetge i la musculatura esquelètica i desencadena resistència a la insulina ^(LIV).

En individus amb resistència a la insulina i DM2 els elevats nivells en sèrum de compostos fenòlics d'origen microbià i aminoàcids de cadena ramificada han estat apuntats ^(VII). Semblaria que aquests subjectes tenen un microbioma amb un gran potencial per la síntesis d'aminoàcids de cadena ramificada (com *Prevotella copri* i *Bacteroides vulgatus*), però un baix potencial pel seu catabolisme ^(VII). Un estudi recent sobre intervenció dietètica aporta evidències que suporten els àcids grassos de cadena curta com els principals causants dels efectes beneficiosos de la ingesta de carbohidrats fermentables en la sensibilitat a la insulina ^(LV). Una dieta rica en fibra complexa durant 12 setmanes reduïa significativament l'hemoglobina glicada i la glicèmia basal, i millorava la tolerància a la glucosa en pacients amb DM2 ^(LV). L'anàlisi metagenòmic de la microbiota fecal rebel·lava que les vies microbianes implicades en la producció de butirat i acetat es trobaven significativament incrementades en pacients que seguien aquesta dieta rica en fibra ^(LV). És d'interès que quan es va avaluar aquells pacients que millor responien a la dieta *versus* els que no responien tant bé, s'apreciava que els que responien mostraven una millor capacitat genètica microbiana per fermentar fibres i produir àcids grassos de cadena curta, en particular l'acetat i el butirat. Per contra, els que pitjor responien acumulaven gens implicats en la producció de metabòlits proteolítics, com serien els indols i el H_2S ^(LV). En un estudi pilot publicat el 2018, on homes primis i homes amb síndrome metabòlica eren tractats diàriament amb 4 g de sodi butirat durant 4 setmanes ^(LVI), s'apreciava una millora significativa en la sensibilitat a la insulina en els controls primis però no en els que presentaven trastorn metabòlic ^(LVI). Això suggereix que el

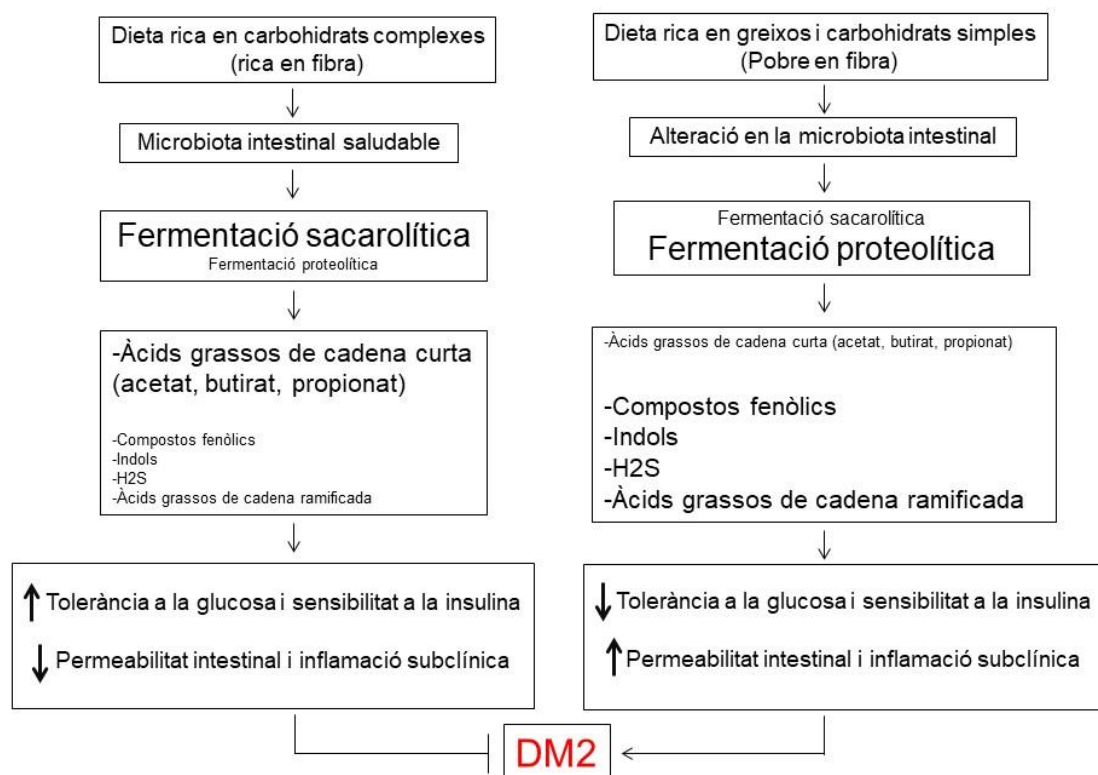
maneig i/o la senyalització dels àcids grassos de cadena curta podria estar alterada en subjectes amb síndrome metabòlica. És igualment important considerar un estudi on en subjectes joves i sans els oligosacàrids fermentables incrementaven l'abundància de bifidobacteria però reduïen l'abundància d'altres bacteries productores d'àcids grassos de cadena curta, promovent outputs inclús adversos sobre l'homeòstasis de la glucosa (^{LVII}).

Estudis en humans on es fan infusions agudes d'àcids grassos de cadena curta al colon distal (i no al proximal) aconseguen incrementar l'oxidació lipídica i atenuar la lipòlisis (^{XXXIII,XXXIX}). Des d'un punt de vista terapèutic la modificació efectiva de la microbiota produïda pel substrat que incrementa la disponibilitat de fibra alimentaria i la formació de àcids grassos de cadena curta en la regió distal del colon i redueixi els productes perjudicials derivats de la fermentació proteolítica, podrien aportar una nova estratègia dietètica per prevenir i/o tractar les malalties metabòliques, com la DM2 (**Figura 1**).

D'aquests estudis ens hauríem de quedar amb aquestes consideracions:

- i) És important mantenir nivells alts de diversitat i abundància de bacteries productores d'àcids grassos de cadena curta
- ii) La importància de la regió del colon on es fermenten les fibres

Figura 1 Dieta, flora intestinal, fermentació, metabòlica i DM2.



Endotoxemia metabòlica

Components estructurals d'origen microbià contribueixen significativament a la regulació del metabolisme energètic i l'homeòstasis de la glucosa i els lípids (^{LVIII-LX}). Des del descobriment de lipopolisacàrid bacterià (LPS) com un actor involucrat en l'origen de les alteracions metabòliques associades amb el sobrepès i l'obesitat (e.g. resistència a la insulina, intolerància a la glucosa i esteatosis hepàtica), altres components microbians com els peptidoglicans o la flagel·lina han demostrat un paper causal en la regulació de processos metabòlics (^{LXI,LXII}). A més dels canvis en la composició de la microbiota intestinal, s'accepta ara que diversos factors contribueixen a la translocació de components bacterians del lumen intestinal cap al torrent sanguini. En condicions normals hi ha una correcta funció de la barrera intestinal, gràcies a una adequada quantitat de proteïnes d'unió, gruix i composició de la capa mucosa, presència de factors antimicrobians, limfòcits intraepiteliais i altres cèl·lules immunes adaptatives, inclosa la correcta producció d'immunoglobulina A (^{LXIII}). Dades recents han demostrat l'acumulació de cèl·lules T a l'intestí de pacients obesos que consumeixen dietes riques en greixos (^{LXIV}). Per l'altra banda, les cèl·lules "mucosal-associated invariant T" que mostren una elevada producció de citocines característiques de Th1 i Th17 en pacients amb obesitat i DM2 es troben significativament reduïdes (^{LXV}).

En un estudi recent demostren que la hiperglucèmia és una causa directa de disfunció en la barrera intestinal i susceptibilitat a infeccions entèriques (^{LXVI}). La hiperglucèmia produeix una reprogramació global del transcriptoma epitelial, amb més de 1,000 gens diferentment expressats. Aquests gens estan involucrats en funcions intracel·lulars relacionades amb el manteniment i la funció de la barrera epitelial. Amb experiments *in vitro*, alguns autors demostren que la reprogramació de la funció metabòlica produïda a les cèl·lules epitelials per la glucosa es dona a través del transportador 2 de glucosa, o GLUT2. Essent, doncs, GLUT2 responsable de les alteracions en el transcriptoma i la integritat de la barrera intestinal, i també d'una defensa defectuosa de l'hoste contra infeccions entèriques, específicament, la susceptibilitat a *Clostridium rodentium*. Finalment, en aquest estudi reporten en 27 individus sans que la hemoglobina glicosilada es relaciona amb components microbians que actuarien de lligands de receptors de reconeixement de patògens, com NLR i TLR4 (^{LXVI}). En un altre treball (^{LX}), demostren que la reprogramació de la flora de ratolins amb extractes microbians de l'ílium de ratolins diabètics té un efecte promotor en l'adquisició dels trastorns metabòlics associats comunament a una dieta diabetogènica.

Estratègies per la prevenció i tractament de la DM2 mitjançant la modificació de la microbiota intestinal

Ús d'antibiòtics

Un ampli ventall d'estudis en ratolins demostren efectes beneficiosos de l'administració de antibiòtics sobre paràmetres relacionats amb la sensibilitat a la insulina, millorant la tolerància a la glucosa (^{LXXII-LXX}). Per exemple, Zarrinpar *et al.* (^{LXX}) demostren que la depleció de la microbiota induïda per antibiòtics (i.e. reducció de l'abundància de Firmicutes i Bacteroidetes al lumen intestinal) millorava la tolerància a la glucosa i sensibilitat a la insulina sense alterar l'adipositat. Aquests canvis s'associen a una reducció significativa en el lumen dels àcids grassos de cadena curta (principalment el butirat) i els àcids biliars secundaris. Semblaria que la baixa disponibilitat de butirat al colon (principal font energètica dels colonòcits) incrementa l'ús de glucosa com a font d'energia. D'aquesta manera es modularien els nivells de glucosa circulants. O sigui, es remodelaria el teixit intestinal per absorbir menys glucosa, i aquesta es destinaria a suportar la demanda energètica dels colonòcits (^{LXX}). En aquest treball la depleció de microbiota es realitza mitjançant quatre antibiòtics d'ampli espectre. En contraposició, quan s'utilitza una baixa dosi d'antibiòtics s'indueix disbiosis, reduint la diversitat microbiana que condueix un estat d'hiperglucèmia sostingut, l'augment de l'adipositat i resistència a la insulina (^{LXXI-LXXIII}).

No obstant, en un estudi realitzat en 20 homes obesos amb síndrome metabòlica que eren tractats de manera aleatòria amb amoxicilina o vancomicina, es va demostrar que la vancomicina, però no l'amoxicilina, produïa una **i)** reducció de la diversitat microbiana per disminució de bacteries gram positives (principalment, Firmicutes, entre les que se'n destaca la *Faecalibacterium prausnitzii*), **ii)** un increment compensatori de bacteries gram-negatives (principalment de Proteobacteria), **iii)** una reducció dels àcids biliars secundaris en la femta, **iv)** una elevació en la presència d'àcids biliars primaris al plasma i, finalment, **v)** una reducció de la sensibilitat a la insulina (^{LXXIV}). En estudis retrospectius s'ha vist que l'administració sostinguda de vancomicina promou el desenvolupament d'obesitat (^{LXXV}). En línia aquests resultats, dos estudis en cohorts de gran mida mostral recolzen l'efecte diabetogènic de l'administració d'antibiòtics (^{LXXVI, LXXVII}). Tot i això, en estudis posteriors en pacients amb obesitat i prediabetes no s'apreciarien efectes significatius sobre la sensibilitat a la insulina sistèmica o hepàtica, ni en la tolerància a la glucosa (^{LXXVIII, LXXIX}). En un d'aquests treballs (^{LXXIX}), confirmen que la vancomicina, però no l'amoxicilina, redueix la diversitat microbiana, els firmicutes productors de butirat i altres àcids grassos de cadena curta, i el metabolisme dels àcids biliars, reduint també els nivells fecals i en plasma d'àcids biliars secundaris i

d'àcids grassos de cadena curta, com el butirat i acetat (aquest últim principalment en femta), sense afectar però la sensibilitat a la insulina, el balanç energètic, les hormones i els metabòlits postprandials, la inflamació sistèmica, la permeabilitat intestinal i la mida de l'adipòcit. De fet, la vancomicina disminueix molt els bacteris que també es troben reduïts en pacients amb DM2, com les espècies productores de butirat, *Clostridium* clúster IV i XIVa, el *Coprococcus eutactus*, el *Faecalibacterium prausnitzii* i l'*Anaerostipes caccae*, al igual que espècies involucrades en la deshidroxilació d'àcids biliars com el *Clostridium leptum*. Pel contrari, les gram negatives Proteobacteria i membres de *Clostridium* cluster IX i Bacilli resistents a vancomicina (e.g. *Enterococcus* i *Lactobacillus plantarum*) estarien augmentades després del tractament, seguint un patró similar al que describia l'estudi de Vrieze i col·laboradors^(LXXIV). Cal destacar que segons els autors aquesta alteració en la composició de la microbiota es mantenia encara 8 setmanes després de deixar el tractament amb vancomicina. L'amoxicilina no afectava la microbiota ni després dels 7 dies ni a les 8 setmanes, en línia també amb troballes d'estudis anteriors^(LXXIV). Val a dir, tot i que alguns investigadors no troben efectes en la mida de l'adipòcit, si que se n'han descrit canvis en el patró d'expressió gènica en el teixit adipós subcutani de la zona abdominal a les 8 setmanes post-tractament^(LXXIX). Específicament, el tractament amb vancomicina i, en menor grau, amb amoxicil·lina, incrementa l'expressió de gens relacionats amb la via de senyalització PPARG i la funció mitocondrial, dos processos claus en la fisiologia del teixit adipós^(LXXX,LXXXI), i redueix l'expressió de vies relacionades amb la inflamació del teixit adipós (e.g. via de senyalització NFκB) i senescència cel·lular. Tot plegat vindria a suggerir efectes beneficiosos a llarg termini en la fisiologia de teixit adipós.

Efecte de la restricció calòrica

Suàrez-Zamorano *et al.*^(LXXXII) demostren que la depleció de microbiota, ja sigui en ratolins lliures de gèrmens o en ratolins tractats amb antibiòtics, millora la sensibilitat a la insulina (mesurada per clamp hiperinsulinèmic i euglicèmic), i que el principal teixit que captava aquesta glucosa era el teixit adipós blanc inguinal i perigonadal. A més, demostraven que aquest teixit adipós era molt més termogènic i tenia incrementats de manera molt significativa els marcadors d'adipòcit marró, indicant que els efectes de la depleció de microbiota en la sensibilitat a la insulina podrien estar mediat per l'activació de la termogènesi al teixit adipós. Associat amb aquest increment també augmenten els marcadors de citocines de tipus 2, antiinflamatòries com la IL4, IL13 i IL5, i els eosinòfils i els macròfags tipus 2^(LXXXII).

Un estudi recent en ratolins (^{LXXXIII}) demostra que un règim de dejú sostingut estimula selectivament la formació de teixit adipós marró i beix dins el teixit adipós blanc, però que no activa el teixit adipós marró propiament dit, i que això s'associa a una millora de l'obesitat, la resistència a la insulina i l'esteatosi hepàtica. Aquest règim incrementa els bacteris fermentadors, l'acetat i el lactat tant en l'intestí com al sèrum, i promou l'expressió dels adipòcits de tipus beix del transportador 1 monocarboxil·lat, cosa que permetria la incorporació de lactat i acetat per part de l'adipòcit. Els ratolins amb la microbiota inhibida són resistents als efectes positius de la restricció calòrica, mentre que el transplantament de femta que prové de ratolins sota restricció calòrica en potencia el "beiging", la termogènesi del WAT, i millora paràmetres metabòlics com la sensibilitat a la insulina. A més, aquest règim de restricció calòrica incrementa la ratio Firmicutes/Bacteroidetes (^{LXXXIII}). En línia amb aquest estudi, l'efecte inductor del "beiging/browning" de l'acetat ha estat prèviament demostrat (^{LXXXVIII}). De fet, en subjectes amb obesitat mòrbida els nivells d'acetat en plasma es correlacionen positivament amb l'abundància relativa de la família Ruminococcaceae (filum firmicutes), i amb la sensibilitat a la insulina i l'expressió de gens termogènics (e.g. PRDM16, UCP1, DIO2) al teixit adipós subcutani (^{LXXXIV}). Aquest treball (^{LXXXIV}) relacionava per primera vegada en humans la microbiota intestinal amb el "browning" del teixit adipós i la millora en la sensibilitat a la insulina, possiblement, a través dels nivells circulants d'acetat. D'altra banda, l'abundància relativa de bacteris del filum Bacteroidetes i Proteobacteria es trobava augmentada en pacients obesos mòrbids resistents a la insulina (^{LXXXIV}).

En un estudi publicat a finals de 2018 (^{LXXXV}) on també investiguen la relació entre microbiota, restricció calòrica i "browning", també troben que la restricció calòrica provoca canvis en la composició de la microbiota que milloren l'estat metabòlic a través de la potenciació del "browning" al teixit adipós blanc. Aquest estudi va més enllà, i descriu que això s'associa també a una baixa expressió de enzimes bacterianes requerides per la biosíntesi de Lipid A, un component crucial per la formació de LPS. La reducció del LPS marca el to de la resposta immune durant la restricció calòrica, incrementant la infiltració de eosinòfils i la polarització dels macròfags M2 (antinflamatoris) al teixit adipós d'animals sota restricció calòrica. L'administració de LPS reverteix els efectes beneficiosos de la restricció calòrica. La supressió farmacològica i genètica de la via de senyalització de LPS-TLR4 tindria un efecte similar a la reducció de LPS per restricció calòrica, incrementant marcadors de "browning" i "beiging" en adipós blanc (^{LXXXV}). En línia amb això, la depleció d'un gen implicat en aquesta via, com seria la proteïna d'unió a lipopolisacàrid (LBP), incrementa l'activitat del teixit adipós marró i la transformació del teixit adipós blanc a marró (^{LXXXVI}).

En humans, l'expressió de LBP es correlaciona negativament amb marcadors de adipòcit marró en el teixit adipós subcutani (^{LXXXVI}).

Efecte de la cirurgia bariàtrica

Un gran ventall d'estudis han demostrat els efectes beneficiosos de la cirurgia bariàtrica en el tractament de la DM2. L'exclusió d'una regió de la part proximal de l'intestí es considera un punt clau en el control de la DM2 després de la cirurgia bariàtrica (^{LXXXVII,LXXXVIII}). El bypass duodè-jejú amb mínima resecció gàstrica ha estat proposat per tractar la DM2 no controlada en pacients amb un índex de massa corporal superior a 35 kg/m². Diversos estudis en ratolins i humans demostren que, després de la cirurgia bariàtrica, hi ha canvis importants en la composició de la microbiota intestinal que es correlacionen amb la millora en el metabolisme de la glucosa i la sensibilitat a la insulina. Aquest canvi en la microbiota inclouria l'increment de bacteris reduïts en obesitat i DM2, com els *Rumminococcus*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* i *Akkermansia* (^{LXXXIX-XCII}).

Efecte de la metformina

La metformina és el fàrmac més prescrit pel tractament de la DM2 perquè es segur, eficient en el control de la glucèmia i redueix la mortalitat cardiovascular. Malgrat això, el seu mecanisme d'acció no està del tot clar. La metformina redueix la hiperglucèmia i la producció hepàtica de glucosa a través de la inhibició del complex 1 mitocondrial (^{XCIII}) i l'activació de l'AMP-activated kinase (o AMPK) (^{XCIV,XCV}), indicant que el fetge pot ser un dels teixits diana. Diverses evidències impliquen el tracte gastrointestinal en l'efecte antidiabètic de la metformina. Estudis inicials en pacients amb DM2 demostraven que solament la meitat de la metformina s'absorbia, i que després s'eliminava ràpidament en orina (~90% en 4 h) (^{XCVI}). En consonància amb això, les concentracions de metformina a la regió proximal del jejú, una regió important per l'absorció de metformina, són de 30 a 300 vegades més altes que al plasma de pacients amb DM2 que prenen el fàrmac (^{XCVII}). La metformina administrada per via intravenosa s'acumula més a l'intestí prim que a la bufeta o el fetge (^{XCVIII}). Considerant que l'administració de metformina oral vs la intravenosa és més efectiva en la reducció dels nivells de glucosa, i que la metformina que s'acumula al jejú activa AMPK per reduir la producció hepàtica de glucosa i controlar els nivells circulants en ratolins diabètics (^{XCIX}), semblaria que l'acumulació a l'intestí podria contribuir significativament al mecanisme d'acció del fàrmac. És d'interès que en els darrers 5 anys s'han publicat estudis que demostren que part dels efectes de la metformina en l'intestí podrien donar-se a través de la modulació de la microbiota (^{VI,XX,C,CI}). En aquests estudis es demostra que la metformina incrementa moltes de les bactèries que

es troben reduïdes en pacients diabètics no tractats, com serien les bacteries productores de butirat (i.e. la major part del fílum de Firmicutes, d'on destacariem *Butyrivibrio*, *Blautia*, *Roseburia* i algunes *Clostridiales*), *Bifidobacterium adolescentis*, *Akkermansia muciniphila* i *Escherichia Coli*. A nivell funcional, s'aprecia un efecte indirecte en la reducció de gens relacionats amb l'absorció de lípid intestinal i la potenciació de gens que participen del metabolisme dels carbohidrats, la biosíntesis de LPS i la inflamació local mediada per LPS, que podria contribuir a donar una certa avantatge competitiva a les espècies d'*Escherichia*. En línia amb l'efecte que té sobre la microbiota, la metformina incrementa les concentracions fecals de butirat i propionat, i els nivells plasmàtics d'àcids biliars primaris i secundaris, que es correlacionaven negativament amb la HbA1c ^(CI). També ha estat demostrat que la transferència de femta de pacients tractats amb metformina a ratolins lliures de gèrmens i alimentats amb dieta diabetogènica millora la tolerància a la glucosa sense efectes significatius en el pes o els nivells d'insulina ^(CI).

Un estudi recent aprofundeix en el mecanisme que pot explicar com la metformina modula a través de la microbiota els nivells de glucosa ^(CII). Específicament, troben que l'administració de metformina restaura l'expressió del sensor de glucosa SGLT1 en la part proximal de l'intestí, que es troba inhibida en condicions de dieta rica en greixos. Això ho fa gràcies en part a l'increment de *Lactobacillus*. L'augment en la captació de glucosa en aquesta regió de l'intestí i a través de SGLT1 incrementa la producció de GLP-1, i això atenuaria la producció hepàtica de glucosa ^(CII). En consonància amb això, estudis anteriors demostren que la potenciació de la gluconeogènesis intestinal atenuen la gluconeogènesis hepàtica i milloren la tolerància a la glucosa ^(XXXV,CIII,CIV). Per exemple, s'ha demostrat que la cirurgia bariàtrica potencia la gluconeogènesis en la regió del jejú i l'ílium i redueix la producció de glucosa hepàtica, en associació amb una pèrdua significativa de pes, associada també a la restricció calòrica que suposa la intervenció ^(CIII,CIV) i metabolits derivats de la microbiota, com serien el butirat i el propionat, que tindrien una especial rellevància en la inducció d'aquest procés ^(CV).

Tot i els efectes beneficiosos de la metformina en pacients diabètics i a través de la microbiota intestinal, caldria tenir en compte que en subjectes sans l'administració de metformina durant 7 dies és més aviat adversa ^(CV). Aquest estudi demostra una baixada significativa en la diversitat microbiana tan sols 24 h després d'iniciar el tractament, el que indicaria que té un efecte immediat en la remodelació de la microbiota, i que aquests canvis s'acompanyen amb increments progressius de patògens oportunistes tipus *Escherichia/Shigella* spp, que es correlacionen amb la intolerància al fàrmac ^(CV). És important tenir

en compte que tot i la dràstica baixada en la diversitat microbiana a les 24 h del tractament, al dia 7 sembla que hi ha una recuperació, tot i que segueix essent inferior a la de la femta basal. També s'ha de tenir en compte que en aquest estudi no s'aprecia un increment de bacteries saludables com Akkermansia o les productores de butirat ^(CV).

Eines terapèutiques per restaurar la microbiota

Probiòtics i prebiòtics

Estudis epidemiològics són consistents demostrant una associació inversa entre la ingesta fibra alimentària (que incrementa la diversitat de la microbiota intestinal humana) i la baixa incidència de DM2 ^(CVI,CVII). Els probiòtics es defineixen com organismes vius que administrats a les quantitats adequades podrien tenir certs beneficis per l'hoste ^(CVIII). Els prebiòtics es defineixen com aquells substrats selectius per microorganismes presents a l'hoste que s'associen amb beneficis en la salut ^(CIX). Estudis en animals demostren que tant l'administració de probiòtics, principalment d'espècies del gènere Bifidobacterium i Lactobacillus ^(CX-CXIV), com els prebiòtics ^(CXV-CXVII) poden tenir efectes beneficiosos en el control dels trastorns metabòlics associats a l'obesitat, i millorar el control glucèmic i la sensibilitat a la insulina. Tot i això, pocs assajos clínics troben un efecte beneficiós de l'administració de probiòtics en el control de la glucèmia ^(CXVIII), i els que ho troben solen tenir un nombre de participants reduïts, són intervencions de més de 8 setmanes, i no controlen la medicació ^(CXVIII). Estudis recents indiquen que l'administració de probiòtics no representa cap millora en paràmetres relacionats amb la tolerància a la glucosa i la sensibilitat a la insulina en pacients amb diabetis gestacional ^(CXIX-CXXI), ni en pacients amb DM2 ^(CXXII). Quelcom similar sembla que podria passar també amb els prebiòtics. Canfora i col·laboradors investigaren l'efecte de l'administració de **galacto-oligosacàrids** durant 12 setmanes en la composició de la microbiota i la sensibilitat a la insulina en pacients obesos prediabètics a través d'un estudi doble cec ^(CXXIII). L'administració de galacto-oligosacàrids incrementava les espècies de Bifidobacterium però no s'apreciava cap efecte significatiu en els nivells d'àcids grassos de cadena curta al plasma o la femta, ni en la sensibilitat a la insulina perifèrica o al teixit adipós, ni en marcadors d'endotoxemia metabòlica o hormones intestinals o incretines ^(CXXIII). En canvi, en un estudi recent demostren que una dieta rica en fibra alimentària (i.e. carbohidrats complexos) selecciona una microbiota productora de butirat i acetat que millora els nivells de glicada en pacients amb DM2 i redueix metabòlits perjudicials per l'intestí, com l'indol i el sulfur d'hidrogen.

Cal tenir present que l'administració de probiòtics després d'un tractament amb antibiòtics podria tenir un efecte més deleteri que beneficiós en la microbiota intestinal (^{CXXIV}). La microbiota indígena triga aproximadament 3 mesos a recuperar-se després d'un tractament amb antibiòtics d'una setmana. En aquest estudi (^{CXXIV}), demostraven que l'administració de probiòtics endarreriria significativament la reconstitució de la microbiota indígena, mentre que el transplantament fecal autòleg (i.e. del mateix subjecte abans d'iniciar el tractament amb antibiòtics) accelerava significativament el procés (^{CXXIV}). A més, l'efecte dels probiòtics és específic per cada subjecte, ja que depèn del seu fenotip metabòlic i immunològic, de la seva genètica i del seu microbioma, i caldria una avaluació personalitzada per saber si una determinada combinació de probiòtics és terapèuticament adequada o no per cada pacient (^{CXXV}). Aquestes limitacions en l'ús de probiòtics ens portarien al transplantament de microbiota fecal com l'alternativa terapèutica més plausible.

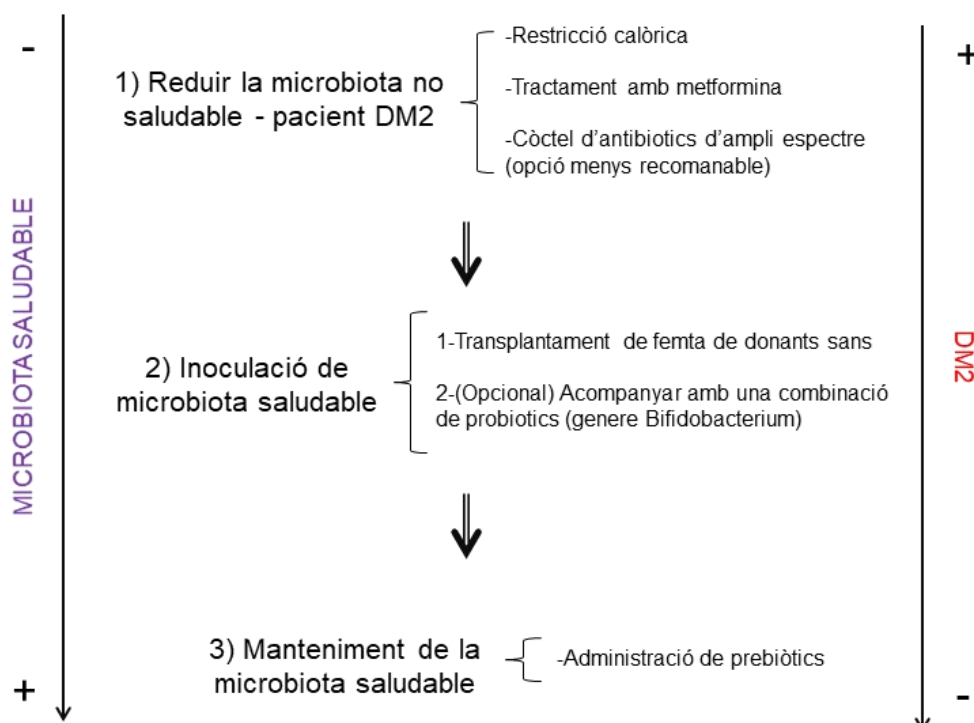
Transplantament de microbiota fecal

En infeccions recurrents de *Clostridium difficile*, els transplantaments de femta han mostrat un major èxit terapèutic que la teràpia convencional amb antibiòtics (^{CXXVI,CXXVII}). En relació als trastorns metabòlics associats a l'obesitat, un estudi pilot va demostrar que el transplantament de femta de donants no obesos sans en pacients obesos amb síndrome metabòlic, millorava significativament la tolerància a la glucosa en els receptors, en paral·lel a la modificació efectiva de la microbiota intestinal del receptor (^{CXXVIII}). Un segon estudi del mateix grup (^{CXXIX}) indicava que 18 setmanes després del transplantament de femta la composició de la microbiota era similar a la basal, de manera que el pacient al llarg del temps recuperava la seva microbiota inicial. En consonància amb això, no s'apreciava cap millora significativa en la sensibilitat a la insulina després del transplantament, ni cap canvi en la metabològica fecal o plasmàtica. En canvi, a les 6 setmanes del transplantament de microbiota sí que s'apreciava una millora en la sensibilitat a la insulina i una reducció en la HbA1c, en paral·lel a un increment en els nivells fecals de acetat però no de butirat (^{CXXIX}). Val a dir que l'efecte del transplantament en la millora de la sensibilitat a la insulina era molt variable, de manera que els autors identificaren receptors sensibles al tractament i receptors resistents. És interessant que en receptors sensibles al transplantament hi havia un increment d'*Akkermansia muciniphila*, una bactèria associada als beneficis metabòlics en estudis d'intervenció en ratolins i humans (^{XVII,XXI}), i tenien una menor diversitat microbiana al inici de la intervenció. Això confirmaria estudis anteriors que suggereixen que una baixa diversitat microbiana basal és predictiva de millora en els paràmetres metabòlics després d'una determinada intervenció (^{CXXX,CXXXI}).

Conclusions i perspectives de futur

Considerant el conjunt d'estudis revisats es podria concloure que l'alteració en l'estructura i la composició de la microbiota intestinal associada a diabetis podria ser conseqüència i, a la vegada, causa d'aquesta patologia. Des d'un punt de vista terapèutic, semblaria que la millor opció seria els transplantament de femta i l'administració de prebiòtics. Tot i això, per tenir èxit en aquestes intervencions, encara cal trobar la manera d'aconseguir una adequada colonització i el manteniment de la microbiota "sana". Una possible estratègia podria ser la combinació de diverses intervencions seguint la següent pauta: Primer, reduir la diversitat i la quantitat bacteriana no saludable (associada a transtorn metabòlic) a través d'una intervenció que provoqui un canvi dràstic (e.g. metformina, restricció calòrica, antibiòtics). Després, colonitzar amb microbiota "sana", via transplantament de femta, que podria estar enriquida o no amb probiòtics. Finalment, mantenir aquesta microbiota amb l'ús de prebiòtics (e.g. fibra alimentària) (**Figura 2**). D'aquesta manera, es podria aconseguir que la recuperació de la microbiota vagi en paral·lel amb la millora del pacient, i s'estableixi un mutualisme entre la microbiota intestinal i l'hoste que permeti una remodelació de llarga durada del microbioma associat a una microbiota saludable i estable. Futurs estudis s'hauran de dissenyar per testar i validar aquesta estratègia terapèutica.

Figura 2 Estratègia terapèutica per DM2 basada en microbiota intestinal.



Bibliografia

- i. Canfora EE, Meex RCR, Venema K, Blaak EE Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol* 2019; doi: 10.1038/s41574-019-0156-z.
- ii. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, Costea PI, Godneva A, Kalka IN, Bar N, Shilo S, Lador D, Vila AV, Zmora N, Pevsner-Fischer M, Israeli D, Kosower N, Malka G, Wolf BC, Avnit-Sagi T, Lotan-Pompan M, Weinberger A, Halpern Z, Carmi S, Fu J, Wijmenga C, Zernakova A, Elinav E, Segal E Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 2018;555:210-215
- iii. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010;5:e9085
- iv. Yassour M, Lim MY, Yun HS, Tickle TL, Sung J, Song YM, Lee K, Franzosa EA, Morgan XC, Gevers D, Lander ES, Xavier RJ, Birren BW, Ko G, Huttenhower C Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes. *Genome Med* 2016;8:17
- v. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013;498:99-103
- vi. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, Prifti E, Vieira-Silva S, Gudmundsdottir V, Pedersen HK, Arumugam M, Kristiansen K, Voigt AY, Vestergaard H, Hercog R, Costea PI, Kultima JR, Li J, Jørgensen T, Levenez F, Dore J; MetaHIT consortium, Nielsen HB, Brunak S, Raes J, Hansen T, Wang J, Ehrlich SD, Bork P, Pedersen O Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015;528:262-266
- vii. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyotylainen T, Nielsen T, Jensen BA, Forslund K, Hildebrand F, Prifti E, Falony G, Le Chatelier E, Levenez F, Doré J, Mattila I, Plichta DR, Pöhö P, Hellgren LI, Arumugam M, Sunagawa S, Vieira-Silva S, Jørgensen T, Holm JB, Trošt K; MetaHIT Consortium, Kristiansen K, Brix S, Raes J, Wang J, Hansen T, Bork P, Brunak S, Oresic M, Ehrlich SD, Pedersen O Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 2016;535:376-381.
- viii. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, Lewis GD, Fox CS, Jacques PF, Fernandez C, O'Donnell CJ, Carr SA, Mootha VK, Florez JC, Souza A, Melander O, Clish CB, Gerszten RE Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 2011;17:448-453.
- ix. Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, Jensen BAH, Damgaard MTF, Bahl MI, Licht TR, Hansen TH, Nielsen T, Dantoft TM, Linneberg A, Jørgensen T, Vestergaard H, Kristiansen K, Franks PW; IMI-DIRECT consortium,

- Hansen T, Bäckhed F, Pedersen O Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia* 2018;61:810-820
- x. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, Ji L Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One* 2013;8:e71108
- xi. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:1469-1476
- xii. Romani-Pérez M, Agusti A, Sanz Y Innovation in microbiome-based strategies for promoting metabolic health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2017;20:484-491
- xiii. Cani PD Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* 2018;67:1716-1725
- xiv. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, Cani PD Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:9066-9071
- xv. Schneeberger M, Everard A, Gómez-Valadés AG, Matamoros S, Ramírez S, Delzenne NM, Gomis R, Claret M, Cani PD *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Sci Rep* 2015;5:16643
- xvi. PMID:28668709; Singh DP, Singh J, Boparai RK, Zhu J, Mantri S, Khare P, Khardori R, Kondepudi KK, Chopra K, Bishnoi M Isomalto-oligosaccharides, a prebiotic, functionally augment green tea effects against high fat diet-induced metabolic alterations via preventing gut dysbacteriosis in mice. *Pharmacol Res* 2017;123:103-113
- xvii. Greer RL, Dong X, Moraes AC, Zielke RA, Fernandes GR, Peremyslova E, Vasquez-Perez S, Schoenborn AA, Gomes EP, Pereira AC, Ferreira SR, Yao M, Fuss IJ, Strober W, Sikora AE, Taylor GA, Gulati AS, Morgun A, Shulzhenko N *Akkermansia muciniphila* mediates negative effects of IFN γ on glucose metabolism. *Nat Commun.* 2016;7:13329
- xviii. Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, Kayser BD, Levenez F, Chilloux J, Hoyles L; MICRO-Obes Consortium, Dumas ME, Rizkalla SW, Doré J, Cani PD, Clément K *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut.* 2016;65:426-436
- xix. Ponziani FR, Bhoori S, Castelli C, Putignani L, Rivoltini L, Del Chierico F, Sanguinetti M, Morelli D, Paroni Sterbini F, Petito V, Reddel S, Calvani R, Camisaschi C, Picca A, Tuccitto A, Gasbarrini A, Pompili M, Mazzaferro V Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Gut Microbiota Profile and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 2019;69:107-120

- xx. de la Cuesta-Zuluaga J, Mueller NT, Corrales-Agudelo V, Velásquez-Mejía EP, Carmona JA, Abad JM, Escobar JS 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* 2017;40:54-62
- xxi. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, van der Ark KC, Aalvink S, Martinez LO, Dumas ME, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, Belzer C, de Vos WM, Cani PD A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 2017;23:107-113
- xxii. Li J, Lin S, Vanhoutte PM, Woo CW, Xu A Akkermansia Muciniphila Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe^{-/-} Mice. *Circulation* 2016;133:2434-2446
- xxiii. Hänninen A, Toivonen R, Pöysti S, Belzer C, Plovier H, Ouwerkerk JP, Emani R, Cani PD, De Vos WM Akkermansia muciniphila induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice. *Gut* 2018;67:1445-1453
- xxiv. Ottman N, Reunanen J, Meijerink M, Pietilä TE, Kainulainen V, Klievink J, Huuskonen L, Aalvink S, Skurnik M, Boeren S, Satokari R, Mercenier A, Palva A, Smidt H, de Vos WM, Belzer C Pili-like proteins of Akkermansia muciniphila modulate host immune responses and gut barrier function. *PLoS One* 2017;12:e0173004
- xxv. Ottman N, Geerlings SY, Aalvink S, de Vos WM, Belzer C Action and function of Akkermansia muciniphila in microbiome ecology, health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2017;31:637-642
- xxvi. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, Rusakiewicz S, Routy B, Roberti MP, Duong CP, Poirier-Colame V, Roux A, Becharef S, Formenti S, Golden E, Cording S, Eberl G, Schlitzer A, Ginhoux F, Mani S, Yamazaki T, Jacquelot N, Enot DP, Bérard M, Nigou J, Opolon P, Eggermont A, Woerther PL, Chachaty E, Chaput N, Robert C, Mateus C, Kroemer G, Raoult D, Boneca IG, Carbonnel F, Chamaillard M, Zitvogel L Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 2015;350:1079-1084
- xxvii. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, Fluckiger A, Messaoudene M, Rauber C, Roberti MP, Fidelle M, Flament C, Poirier-Colame V, Opolon P, Klein C, Iribarren K, Mondragón L, Jacquelot N, Qu B, Ferrere G, Clémenson C, Mezquita L, Masip JR, Naltet C, Brosseau S, Kaderbhai C, Richard C, Rizvi H, Levenez F, Galleron N, Quinquis B, Pons N, Ryffel B, Minard-Colin V, Gonin P, Soria JC, Deutsch E, Lloriot Y, Ghiringhelli F, Zalcman G, Goldwasser F, Escudier B, Hellmann MD, Eggermont A, Raoult D, Albiges L, Kroemer G, Zitvogel L Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 2018;359:91-97

- xxviii. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, Luke JJ, Gajewski TF The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 2018;359:104-108
- xxix. Louis P, Flint HJ Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 2009;294:1-8
- xxx. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 2009;11:2574-2584
- xxxi. Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J.* 2017;11:841-852
- xxxii. Ferreira-Halder CV, Faria AVS, Andrade SS Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2017;31:643-648
- xxxiii. Canfora EE, van der Beek CM, Jocken JWE, Goossens GH, Holst JJ, Olde Damink SWM, Lenaerts K, Dejong CHC, Blaak EE Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: a randomized crossover trial. *Sci Rep* 2017;7:2360
- xxxiv. Goswami C, Iwasaki Y, Yada T Short-chain fatty acids suppress food intake by activating vagal afferent neurons. *J Nutr Biochem* 2018;57:130-135
- xxxv. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, Bäckhed F, Mithieux G Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 2014;156:84-96
- xxxvi. Byrne CS, Chambers ES, Alhabeeb H, Chhina N, Morrison DJ, Preston T, Tedford C, Fitzpatrick J, Irani C, Busza A, Garcia-Perez I, Fountana S, Holmes E, Goldstone AP, Frost GS Increased colonic propionate reduces anticipatory reward responses in the human striatum to high-energy foods. *Am J Clin Nutr* 2016;104:5-14
- xxxvii. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, Cefalu WT, Ye J Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 2009;58:1509-1517
- xxxviii. Sahuri-Arisoylu M, Brody LP, Parkinson JR, Parkes H, Navaratnam N, Miller AD, Thomas EL, Frost G, Bell JD Reprogramming of hepatic fat accumulation and 'browning' of adipose tissue by the short-chain fatty acid acetate. *Int J Obes (Lond)* 2016;40:955-963
- xxxix. van der Beek CM, Canfora EE, Lenaerts K, Troost FJ, Damink SWMO, Holst JJ, Masclee AAM, Dejong CHC, Blaak EE Distal, not proximal, colonic acetate infusions promote fat oxidation and improve metabolic markers in overweight/obese men. *Clin Sci (Lond)* 2016;130:2073-2082
- xl. Chambers ES, Byrne CS, Aspey K, Chen Y, Khan S, Morrison DJ, Frost G Acute oral sodium propionate supplementation raises resting energy

- expenditure and lipid oxidation in fasted humans. *Diabetes Obes Metab* 2018;20:1034-1039
- xli. Priyadarshini M, Villa SR, Fuller M, Wicksteed B, Mackay CR, Alquier T, Poitout V, Mancebo H, Mirmira RG, Gilchrist A, Layden BT An Acetate-Specific GPCR, FFAR2, Regulates Insulin Secretion. *Mol Endocrinol* 2015;29:1055-1066
- xliv. McNelis JC, Lee YS, Mayoral R, van der Kant R, Johnson AM, Wollam J, Olefsky JM GPR43 Potentiates β -Cell Function in Obesity. *Diabetes* 2015;64:3203-3217
- xlvi. Veprik A, Laufer D, Weiss S, Rubins N, Walker MD GPR41 modulates insulin secretion and gene expression in pancreatic β -cells and modifies metabolic homeostasis in fed and fasting states. *FASEB J* 2016;30:3860-3869
- xlvii. Pingitore A, Chambers ES, Hill T, Maldonado IR, Liu B, Bewick G, Morrison DJ, Preston T, Wallis GA, Tedford C, Castañera González R, Huang GC, Choudhary P, Frost G, Persaud SJ The diet-derived short chain fatty acid propionate improves beta-cell function in humans and stimulates insulin secretion from human islets in vitro. *Diabetes Obes Metab* 2017;19:257-265
- xlviii. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, Duchamp A, Bäckhed F, Mithieux G Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metab* 2016;24:151-157
- xliv. Jakobsdottir G, Xu J, Molin G, Ahrné S, Nyman M High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation, liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects. *PLoS One* 2013;8:e80476
- xlv. van Diepen JA, Robben JH, Hooiveld GJ, Carmone C, Alsady M, Boutens L, Bekkenkamp-Grovenstein M, Hijmans A, Engelke UFH, Wevers RA, Netea MG, Tack CJ, Stienstra R, Deen PMT SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes. *Diabetologia* 2017;60:1304-1313
- xlvi. Serena C, Ceperuelo-Mallafré V, Keiran N, Queipo-Ortuño MI, Bernal R, Gomez-Huelgas R, Urpi-Sarda M, Sabater M, Pérez-Brocal V, Andrés-Lacueva C, Moya A, Tinahones FJ, Fernández-Real JM, Vendrell J, Fernández-Veledo S Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J* 2018;12:1642-1657
- xlvii. Wu L, Yang W, Jia X, Yang G, Duridanova D, Cao K, Wang R Pancreatic islet overproduction of H₂S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Lab Invest* 2009;89:59-67
- xlviii. I. Yang G, Yang W, Wu L, Wang R H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *J Biol Chem* 2007;282:16567-16576
- xlix. li. Zhang L, Yang G, Untereiner A, Ju Y, Wu L, Wang R Hydrogen sulfide impairs glucose utilization and increases gluconeogenesis in hepatocytes. *Endocrinology* 2013;154:114-126

- iii. Jain SK, Bull R, Rains JL, Bass PF, Levine SN, Reddy S, McVie R, Bocchini JA Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxid Redox Signal* 2010;12:1333-1337
- liii. Okamoto M, Yamaoka M, Takei M, Ando T, Taniguchi S, Ishii I, Tohya K, Ishizaki T, Niki I, Kimura T Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;442:227-233
- liv. Koppe L, Pillon NJ, Vella RE, Croze ML, Pelletier CC, Chambert S, Massy Z, Glorieux G, Vanholder R, Dugenet Y, Soula HA, Fouque D, Soulage CO p-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:88-99
- iv. Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, Fu H, Xue X, Lu C, Ma J, Yu L, Xu C, Ren Z, Xu Y, Xu S, Shen H, Zhu X, Shi Y, Shen Q, Dong W, Liu R, Ling Y, Zeng Y, Wang X, Zhang Q, Wang J, Wang L, Wu Y, Zeng B, Wei H, Zhang M, Peng Y, Zhang C Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science* 2018;359:1151-1156
- lvi. Bouter K, Bakker GJ, Levin E, Hartstra AV, Kootte RS, Udayappan SD, Katiraei S, Bahler L, Gilijamse PW, Tremaroli V, Stahlman M, Holleman F, van Riel NAW, Verberne HJ, Romijn JA, Dallinga-Thie GM, Serlie MJ, Ackermans MT, Kemper EM, Willems van Dijk K, Backhed F, Groen AK, Nieuwdorp M Differential metabolic effects of oral butyrate treatment in lean versus metabolic syndrome subjects. *Clin Transl Gastroenterol* 2018;9:155
- lvii. Liu F, Li P, Chen M, Luo Y, Prabhakar M, Zheng H, He Y, Qi Q, Long H, Zhang Y, Sheng H, Zhou H Fructooligosaccharide (FOS) and Galactooligosaccharide (GOS) Increase Bifidobacterium but Reduce Butyrate Producing Bacteria with Adverse Glycemic Metabolism in healthy young population. *Sci Rep* 2017;7:11789
- lviii. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761-1772
- lix. Everard A, Geurts L, Caesar R, Van Hul M, Matamoros S, Duparc T, Denis RG, Cochez P, Pierard F, Castel J, Bindels LB, Plovier H, Robine S, Muccioli GG, Renaud JC, Dumoutier L, Delzenne NM, Luquet S, Bäckhed F, Cani PD Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status. *Nat Commun* 2014;5:5648
- ix. Pomié C, Blasco-Baque V, Klopp P, Nicolas S, Waget A, Loubières P, Azalbert V, Puel A, Lopez F, Dray C, Valet P, Lelouvier B, Servant F, Courtney M, Amar J, Burcelin R, Garidou L Triggering the adaptive

- immune system with commensal gut bacteria protects against insulin resistance and dysglycemia. *Mol Metab* 2016;5:392-403
- Ixi. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010;328:228-231
- Ixii. Denou E, Lolmède K, Garidou L, Pomie C, Chabo C, Lau TC, Fullerton MD, Nigro G, Zakaroff-Girard A, Luche E, Garret C, Serino M, Amar J, Courtney M, Cavallari JF, Henriksbo BD, Barra NG, Foley KP, McPhee JB, Duggan BM, O'Neill HM, Lee AJ, Sansonetti P, Ashkar AA, Khan WI, Surette MG, Bouloumié A, Steinberg GR, Burcelin R, Schertzer JD Defective NOD2 peptidoglycan sensing promotes diet-induced inflammation, dysbiosis, and insulin resistance. *EMBO Mol Med* 2015;7:259-274
- Ixiii. Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, Theodorou V, Dekker J, Méheust A, de Vos WM, Mercenier A, Nauta A, Garcia-Rodenas CL Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017;312:G171-G193
- Ixiv. Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, André S, Poitou C, Allatif O, Cotillard A, Fohrer-Ting H, Hubert EL, Remark R, Genser L, Tordjman J, Garbin K, Osinski C, Sautès-Fridman C, Leturque A, Clément K, Brot-Laroche E Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab* 2015;22:113-124
- Ixv. Magalhaes I, Pingris K, Poitou C, Bessoles S, Venteclef N, Kiaf B, Beaudoin L, Da Silva J, Allatif O, Rossjohn J, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Ledoux S, Genser L, Torcivia A, Soudais C, Lantz O, Boitard C, Aron-Wisniewsky J, Larger E, Clément K, Lehuen A Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J Clin Invest* 2015;125:1752-1762
- Ixvi. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, Braverman S, Tengeler AC, Barak O, Elazar M, Ben-Zeev R, Lehavi-Regev D, Katz MN, Pevsner-Fischer M, Gertler A, Halpern Z, Harmelin A, Amar S, Serradas P, Grosfeld A, Shapiro H, Geiger B, Elinav E Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*. 2018;359:1376-1383
- Ixvii. Murphy EF, Cotter PD, Hogan A, O'Sullivan O, Joyce A, Fouhy F, Clarke SF, Marques TM, O'Toole PW, Stanton C, Quigley EM, Daly C, Ross PR, O'Doherty RM, Shanahan F Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut* 2013;62:220-226
- Ixviii. Hwang I, Park YJ, Kim YR, Kim YN, Ka S, Lee HY, Seong JK, Seok YJ, Kim JB Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. *FASEB J* 2015;29:2397-2411

- Ixix. Soto M, Herzog C, Pacheco JA, Fujisaka S, Bullock K, Clish CB, Kahn CR Gut microbiota modulate neurobehavior through changes in brain insulin sensitivity and metabolism. *Mol Psychiatry* 2018;23:2287-2301
- Ixx. Zarrinpar A, Chaix A, Xu ZZ, Chang MW, Marotz CA, Saghatelian A, Knight R, Panda S Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nat Commun* 2018;9:2872
- Ixxi. Mahana D, Trent CM, Kurtz ZD, Bokulich NA, Battaglia T, Chung J, Müller CL, Li H, Bonneau RA, Blaser MJ Antibiotic perturbation of the murine gut microbiome enhances the adiposity, insulin resistance, and liver disease associated with high-fat diet. *Genome Med* 2016;8:48
- Ixxii. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, Gao Z, Mahana D, Raju K, Teitler I, Li H, Alekseyenko AV, Blaser MJ Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 2012;488:621-626
- Ixxiii. Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, Kim SG, Li H, Gao Z, Mahana D, Zárata Rodríguez JG, Rogers AB, Robine N, Loke P, Blaser MJ Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 2014;158:705-721
- Ixxiv. Vrieze A, Out C, Fuentes S, Jonker L, Reuling I, Kootte RS, van Nood E, Holleman F, Knaapen M, Romijn JA, Soeters MR, Blaak EE, Dallinga-Thie GM, Reijnders D, Ackermans MT, Serlie MJ, Knop FK, Holst JJ, van der Ley C, Kema IP, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JB, Stroes ES, Groen AK, Nieuwdorp M Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *J Hepatol* 2014;60:824-831
- Ixxv. Thuny F, Richet H, Casalta JP, Angelakis E, Habib G, Raoult D Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. *PLoS One* 2010;5:e9074
- Ixxvi. Boursi B, Mamtani R, Haynes K, Yang YX The effect of past antibiotic exposure on diabetes risk. *Eur J Endocrinol* 2015;172:639-648
- Ixxvii. Mikkelsen KH, Knop FK, Frost M, Hallas J, Pottegård A Use of Antibiotics and Risk of Type 2 Diabetes: A Population-Based Case-Control Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:3633-3640
- Ixxviii. Mikkelsen KH, Frost M, Bahl MI, Licht TR, Jensen US, Rosenberg J, Pedersen O, Hansen T, Rehfeld JF, Holst JJ, Vilsbøll T, Knop FK Effect of Antibiotics on Gut Microbiota, Gut Hormones and Glucose Metabolism. *PLoS One*. 2015;10:e0142352
- Ixxix. Reijnders D, Goossens GH, Hermes GD, Neis EP, van der Beek CM, Most J, Holst JJ, Lenaerts K, Kootte RS, Nieuwdorp M, Groen AK, Olde Damink SW, Boekschoten MV, Smidt H, Zoetendal EG, Dejong CH, Blaak EE Effects of Gut Microbiota Manipulation by Antibiotics on Host Metabolism in Obese Humans: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Cell Metab* 2016;24:63-74

- Ixxx. Morton NM, Beltram J, Carter RN, Michailidou Z, Gorjanc G, McFadden C, Barrios-Llerena ME, Rodriguez-Cuenca S, Gibbins MT, Aird RE, Moreno-Navarrete JM, Munger SC, Svenson KL, Gastaldello A, Ramage L, Naredo G, Zeyda M, Wang ZV, Howie AF, Saari A, Sipilä P, Stulnig TM, Gudnason V, Kenyon CJ, Seckl JR, Walker BR, Webster SP, Dunbar DR, Churchill GA, Vidal-Puig A, Fernandez-Real JM, Emilsson V, Horvat S Genetic identification of thiosulfate sulfurtransferase as an adipocyte-expressed antidiabetic target in mice selected for leanness. *Nat Med* 2016;22:771-779
- Ixxxi. Virtue S, Petkevicius K, Moreno-Navarrete JM, Jenkins B, Hart D, Dale M, Koulman A, Fernández-Real JM, Vidal-Puig A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 2 Controls the Rate of Adipose Tissue Lipid Storage and Determines Metabolic Flexibility. *Cell Rep* 2018;24:2005-2012.e7
- Ixxxii. Suárez-Zamorano N, Fabbiano S, Chevalier C, Stojanović O, Colin DJ, Stevanović A, Veyrat-Durebex C, Tarallo V, Rigo D, Germain S, Ilievska M, Montet X, Seimbille Y, Hapfelmeier S, Trajkovski M Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat Med* 2015;21:1497-1501
- Ixxxiii. Li G, Xie C, Lu S, Nichols RG, Tian Y, Li L, Patel D, Ma Y, Brouwer CN, Yan T, Krausz KW, Xiang R, Gavrilova O, Patterson AD, Gonzalez FJ Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metab* 2017;26:672-685.e4
- Ixxxiv. Moreno-Navarrete JM, Serino M, Blasco-Baque V, Azalbert V, Barton RH, Cardellini M, Latorre J, Ortega F, Sabater-Masdeu M, Burcelin R, Dumas ME, Ricart W, Federici M, Fernández-Real JM Gut Microbiota Interacts with Markers of Adipose Tissue Browning, Insulin Action and Plasma Acetate in Morbid Obesity. *Mol Nutr Food Res* 2018;62(3).
- Ixxxv. Fabbiano S, Suárez-Zamorano N, Chevalier C, Lazarević V, Kieser S, Rigo D, Leo S, Veyrat-Durebex C, Gaïa N, Maresca M, Merkler D, Gomez de Agüero M, Macpherson A, Schrenzel J, Trajkovski M Functional Gut Microbiota Remodeling Contributes to the Caloric Restriction-Induced Metabolic Improvements. *Cell Metab* 2018;28:907-921.e7
- Ixxxvi. Gavaldà-Navarro A, Moreno-Navarrete JM, Quesada-López T, Cairó M, Giralt M, Fernández-Real JM, Villarroya F Lipopolysaccharide-binding protein is a negative regulator of adipose tissue browning in mice and humans. *Diabetologia*. 2016;59:2208-2218
- Ixxxvii. Cohen RV, Rubino F, Schiavon C, Cummings DE Diabetes remission without weight loss after duodenal bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis* 2012;8:e66-8
- Ixxxviii. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaiconelli A, Nanni G, Castagneto M, Bornstein S, Rubino F Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;386:964-973.
- Ixxxix. Murphy R, Tsai P, Jüllig M, Liu A, Plank L, Booth M Differential Changes in Gut Microbiota After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Bariatric

- Surgery Vary According to Diabetes Remission. *Obes Surg* 2017;27:917-925
- xc. Magouliotis DE, Tasiopoulou VS, Sioka E, Chatedaki C, Zacharoulis D Impact of Bariatric Surgery on Metabolic and Gut Microbiota Profile: a Systematic Review and Meta-analysis. *Obes Surg* 2017;27:1345-1357
- xc. Liou AP, Paziuk M, Luevano JM Jr, Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med* 2013;5:178ra41
- xcii. Cortez RV, Petry T, Caravatto P, Pessôa R, Sanabani SS, Martinez MB, Sarian T, Salles JE, Cohen R, Taddei CR Shifts in intestinal microbiota after duodenal exclusion favor glycemic control and weight loss: a randomized controlled trial. *Surg Obes Relat Dis* 2018;14:1748-1754
- xciii. Owen MR, Doran E, Halestrap AP Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000;348:607-614
- xciv. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001;108:1167-1174
- xcv. Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Pulnilkunnit T, Chen ZP, O'Neill HM, Ford RJ, Palanivel R, O'Brien M, Hardie DG, Macaulay SL, Schertzer JD, Dyck JR, van Denderen BJ, Kemp BE, Steinberg GR Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med* 2013;19:1649-1654.
- xcvi. Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol* 1981;12:235-246
- xcvii. Bailey CJ, Wilcock C, Scarpello JH Metformin and the intestine. *Diabetologia*. 2008;51:1552-1553
- xcviii. Jensen JB, Sundelin EI, Jakobsen S, Gormsen LC, Munk OL, Frøkiær J, Jessen N [11C]-Labeled Metformin Distribution in the Liver and Small Intestine Using Dynamic Positron Emission Tomography in Mice Demonstrates Tissue-Specific Transporter Dependency. *Diabetes*. 2016;65:1724-1730
- xcix. Duca FA, Côté CD, Rasmussen BA, Zadeh-Tahmasebi M, Rutter GA, Filippi BM, Lam TK Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nat Med*. 2015;21:506-511
- c. Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, Bae JW An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 2014;63:727-735.
- ci. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, Ståhlman M, Olsson LM, Serino M, Planas-Fèlix M, Xifra G, Mercader JM, Torrents D, Burcelin R, Ricart W, Perkins R, Fernández-Real JM, Bäckhed

- F Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* 2017;23:850-858
- cii. Bauer PV, Duca FA, Waise TMZ, Rasmussen BA, Abraham MA, Dranse HJ, Puri A, O'Brien CA, Lam TKT Metformin Alters Upper Small Intestinal Microbiota that Impact a Glucose-SGLT1-Sensing Gluoregulatory Pathway. *Cell Metab.* 2018;27:101-117.e5
- ciii. Yan Y, Zhou Z, Kong F, Feng S, Li X, Sha Y, Zhang G, Liu H, Zhang H, Wang S, Hu C, Zhang X Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery Suppresses Hepatic Gluconeogenesis and Increases Intestinal Gluconeogenesis in a T2DM Rat Model. *Obes Surg* 2016;26:2683-2690
- civ. Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, Pillot B, Fauveau V, Aubert R, Viollet B, Foretz M, Leclerc J, Duchamp A, Zitoun C, Thorens B, Magnan C, Mithieux G, Andreelli F Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab* 2008;8:201-211
- cv. Elbere I, Kalnina I, Silamikelis I, Konrade I, Zaharenko L, Sekace K, Radovica-Spalvina I, Fridmanis D, Gudra D, Pirags V, Klovins J Association of metformin administration with gut microbiome dysbiosis in healthy volunteers. *PLoS One* 2018;13:e0204317
- cvi. Tap J, Furet JP, Bensaada M, Philippe C, Roth H, Rabot S, Lakhdari O, Lombard V, Henrissat B, Corthier G, Fontaine E, Doré J, Leclerc M Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. *Environ Microbiol.* 2015;17:4954-4964
- cvii. Martínez I, Lattimer JM, Hubach KL, Case JA, Yang J, Weber CG, Louk JA, Rose DJ, Kyureghian G, Peterson DA, Haub MD, Walter J Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME J* 2013;7:269-280
- cviii. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:506-514
- cix. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:491-502
- cx. Aoki R, Kamikado K, Suda W, Takii H, Mikami Y, Suganuma N, Hattori M, Koga Y A proliferative probiotic Bifidobacterium strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. *Sci Rep* 2017;7:43522.
- cxii. Natividad JM, Lamas B, Pham HP, Michel ML, Rainteau D, Bridonneau C, da Costa G, van Hylckama Vlieg J, Sovran B, Chamignon C, Planchais J,

- Richard ML, Langella P, Veiga P, Sokol H *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nat Commun* 2018;9:2802
- cxii. Tian P, Li B, He C, Song W, Hou A, Tian S, Meng X, Li K, Shan Y Antidiabetic (type 2) effects of *Lactobacillus* G15 and Q14 in rats through regulation of intestinal permeability and microbiota. *Food Funct* 2016;7:3789-3797
- cxiii. Stenman LK, Waget A, Garret C, Klopp P, Burcelin R, Lahtinen S Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Benef Microbes* 2014;5:437-445
- cxiv. Mischke M, Arora T, Tims S, Engels E, Sommer N, van Limpt K, Baars A, Oozeer R, Oosting A, Bäckhed F, Knol J Specific synbiotics in early life protect against diet-induced obesity in adult mice. *Diabetes Obes Metab* 2018;20:1408-1418
- cxv. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, François P, de Vos WM, Delzenne NM, Schrenzel J, Cani PD Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 2011;60:2775-2786
- cxvi. Wang H, Zhang X, Wang S, Li H, Lu Z, Shi J, Xu Z Mannan-oligosaccharide modulates the obesity and gut microbiota in high-fat diet-fed mice. *Food Funct*. 2018;9:3916-3929
- cxvii. Zheng J, Cheng G, Li Q, Jiao S, Feng C, Zhao X, Yin H, Du Y, Liu H Chitin Oligosaccharide Modulates Gut Microbiota and Attenuates High-Fat-Diet-Induced Metabolic Syndrome in Mice. *Mar Drugs* 2018;16. pii: E66
- cxviii. Ruan Y, Sun J, He J, Chen F, Chen R, Chen H Effect of Probiotics on Glycemic Control: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *PLoS One* 2015;10:e0132121
- cxix. Nabhani Z, Hezaveh SJG, Razmpoosh E, Asghari-Jafarabadi M, Gargari BP The effects of synbiotic supplementation on insulin resistance/sensitivity, lipid profile and total antioxidant capacity in women with gestational diabetes mellitus: A randomized double blind placebo controlled clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;138:149-157
- cxx. Callaway LK, McIntyre HD, Barrett HL, Foxcroft K, Tremellen A, Lingwood BE, Tobin JM, Wilkinson S, Kothari A, Morrison M, O'Rourke P, Pelecanos A, Dekker Nitert M Probiotics for the Prevention of Gestational Diabetes Mellitus in Overweight and Obese Women: Findings From the SPRING Double-blind Randomized Controlled Trial. *Diabetes Care* 2019. pii: dc182248
- cxxi. Lindsay KL, Kennelly M, Culliton M, Smith T, Maguire OC, Shanahan F, Brennan L, McAuliffe FM Probiotics in obese pregnancy do not reduce maternal fasting glucose: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial (Probiotics in Pregnancy Study). *Am J Clin Nutr* 2014;99:1432-1439

- cxxii. Mobini R, Tremaroli V, Ståhlman M, Karlsson F, Levin M, Ljungberg M, Sohlin M, Bertéus Forslund H, Perkins R, Bäckhed F, Jansson PA Metabolic effects of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in people with type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 2017;19:579-589
- cxxiii. Canfora EE, van der Beek CM, Hermes GDA, Goossens GH, Jocken JWE, Holst JJ, van Eijk HM, Venema K, Smidt H, Zoetendal EG, Dejong CHC, Lenaerts K, Blaak EE Supplementation of Diet With Galacto-oligosaccharides Increases Bifidobacteria, but Not Insulin Sensitivity, in Obese Prediabetic Individuals. *Gastroenterology* 2017;153:87-97
- cxxiv. Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, Zur M, Regev-Lehavi D, Ben-Zeev Brik R, Federici S, Horn M, Cohen Y, Moor AE, Zeevi D, Korem T, Kotler E, Harmelin A, Itzkovitz S, Maharshak N, Shibolet O, Pevsner-Fischer M, Shapiro H, Sharon I, Halpern Z, Segal E, Elinav E Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell* 2018;174:1406-1423.e16
- cxxv. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, Kotler E, Zur M, Regev-Lehavi D, Brik RB, Federici S, Cohen Y, Linevsky R, Rothschild D, Moor AE, Ben-Moshe S, Harmelin A, Itzkovitz S, Maharshak N, Shibolet O, Shapiro H, Pevsner-Fischer M, Sharon I, Halpern Z, Segal E, Elinav E Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell* 2018;174:1388-1405.e21
- cxxvi. Youngster I, Sauk J, Pindar C, Wilson RG, Kaplan JL, Smith MB, Alm EJ, Gevers D, Russell GH, Hohmann EL Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. *Clin Infect Dis* 2014;58:1515-1522
- cxxvii. Lee CH, Steiner T, Petrof EO, Smieja M, Roscoe D, Nematallah A, Weese JS, Collins S, Moayyedi P, Crowther M, Ropeleski MJ, Jayaratne P, Higgins D, Li Y, Rau NV, Kim PT Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients With Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;315:142-149
- cxxviii. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, Dallinga-Thie GM, Ackermans MT, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Van Hylckama Vlieg JE, Bloks VW, Groen AK, Heilig HG, Zoetendal EG, Stroes ES, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012;143:913-6.e7
- cxxix. Kootte RS, Levin E, Salojärvi J, Smits LP, Hartstra AV, Udayappan SD, Hermes G, Bouter KE, Koopen AM, Holst JJ, Knop FK, Blaak EE, Zhao J, Smidt H, Harms AC, Hankemeijer T, Bergman JJGHM, Romijn HA, Schaap

- FG, Olde Damink SWM, Ackermans MT, Dallinga-Thie GM, Zoetendal E, de Vos WM, Serlie MJ, Stroes ESG, Groen AK, Nieuwdorp M Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab* 2017;26:611-619.e6
- cxxx. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, Almeida M, Quinquis B, Levenez F, Galleron N, Gougis S, Rizkalla S, Batto JM, Renault P; ANR MicroObes consortium, Doré J, Zucker JD, Clément K, Ehrlich SD Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 2013;500:585-588
- cxxxi. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500:541-546.