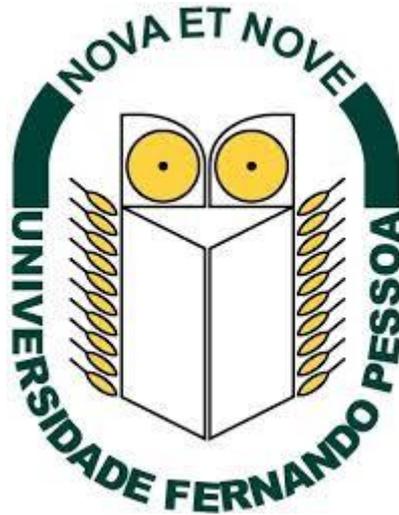


Ana Raquel Reis



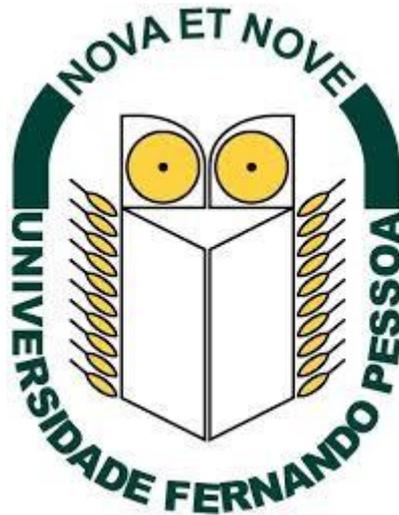
Probióticos, potencialidades e desafios

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019

Ana Raquel Reis



Probióticos, potencialidades e desafios

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019

Probióticos, potencialidades e desafios

Ana Raquel Reis

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção de grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Professora Doutora Maria Gil Ribeiro

Sumário

A microbiota intestinal humana é definida como a totalidade dos microrganismos presentes na superfície epitelial do trato gastrointestinal humano. As suas principais funções incluem a síntese de aminoácidos e vitaminas, e a produção de energia a partir de polissacarídeos. Para além disso, contribui para a integridade da parede intestinal, protege contra microrganismos patogénicos e estimula a ação do sistema imunológico. A relação entre a flora intestinal e a saúde global do organismo tem suscitado um interesse crescente na compreensão dos benefícios da manutenção e/ou modulação da microbiota através do uso de probióticos. Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, conferem benefícios ao organismo. Nos últimos anos, a sua utilização na prevenção e/ou tratamento de doenças de etiologia diversa tem suscitado um grande interesse. A presente revisão bibliográfica explora estes aspetos, procurando compreender as limitações e potencialidades da utilização de probióticos na melhoria da qualidade da saúde, na atualidade e num futuro próximo.

Palavras-chave:

Microbioma, Microbiota, Prebiótico, Probiótico, Probiótico Recombinante, Simbiótico

Abstract

The human intestinal microbiota represents the microorganisms that live on the epithelial surface of the human gastrointestinal tract. Its main functions include the synthesis of amino acids and vitamins, and the production of energy from polysaccharides. In addition, it contributes to the integrity of the intestinal wall, protects against pathogenic microorganisms and stimulates the action of the immune system. The relationship between intestinal flora and health has raised a growing interest in understanding the benefits of maintaining and/or modulating the microbiota through the use of probiotics. Probiotics are living microorganisms that, when administered in appropriate amounts, are beneficial to the body. In recent years, their use in the prevention and/or treatment of diseases of diverse etiology has attracted great interest. The present bibliographic review explores these aspects, trying to understand the limitations and potentialities of the use of probiotics in the improvement of health quality, nowadays and in the near future.

Key words

Microbiome, Microbiota, Prebiotic, Probiotic, Probiotic Designer, Symbiotic

Agradecimentos

À minha família, em particular aos meus pais, por estarem sempre do meu lado, me influenciarem e apoiarem ao longo destes anos da minha vida.

Ao meu namorado, por acreditar em mim e nunca me deixar desistir dos meus objetivos.

À Dra. Maria Benvinda e Dra. Ana Cláudia, Diretora Técnica e Adjunta da Farmácia onde trabalho, o meu especial agradecimento pela oportunidade que me deram em completar este grau acadêmico. O meu muito obrigado pela paciência e compreensão que tiveram comigo ao longo destes anos.

Às amigas e amigos de infância, pela confiança, lealdade que sempre tiveram comigo, por acreditarem em mim e me entusiasmarem a seguir em frente.

Aos amigos da faculdade, principalmente à Cátia Vanessa, Ana Silvestre, Calos Machado, Paulo Carvalho, Soraia Cunha e Catarina Paiva, pela companhia e por fazerem parte desta etapa da minha vida. Sem vocês teria sido muito mais difícil.

À Professora Doutora Gil Ribeiro, minha orientadora, pela disponibilidade que sempre demonstrou.

Índice Geral

Sumário	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vi
Abreviaturas	vii
I.Introdução	1
II.Metodologia	3
III.Desenvolvimento	4
3.1.Probióticos: perspectiva histórica	4
3.2.Microbioma e microbiota	6
3.2.1.Composição	6
3.2.2.Relação com o hospedeiro	8
3.2.3.Fatores influenciadores	9
3.2.3.1.Idade	10
3.2.3.2.Dieta	12
3.2.3.3.Antibióticos	13
3.2.3.4.Genoma Humano e Epigenoma	14
3.3.Probióticos, prebióticos, simbióticos	16
3.3.1.Definição	16
3.3.2.Mecanismos de ação	21
3.3.3.Prevenção e tratamento de doenças	25
3.4.Novos Desafios	30
3.4.1.Engenharia do Microbioma Humano	30
3.4.2.Probióticos Recombinantes	32
IV.Conclusão	36
4.1.Perspetivas futuras	38
V.Referências Bibliográficas	39

Índice de Figuras

Figura 1- Complexidade genética e celular do Microbioma Intestinal	5
Figura 2- Composição da microbiota intestinal	7
Figura 3- Fatores influenciadores da microbiota intestinal	9
Figura 4- Fatores que afetam a microbiota intestinal	11
Figura 5 – Características de um probiótico ideal	18
Figura 6- Mecanismos de ação dos probióticos	21
Figura 7 - Modulação da anti-oxidação por probióticos	24
Figura 8- Visão geral da aplicação e progresso da engenharia de microbiomas	31
Figura 9- Benefícios para a saúde dos probióticos recombinantes	33

Índice de Tabelas

Tabela 1- Microrganismos probióticos utilizados em suplementos alimentares	17
Tabela 2- Uso clínico dos probióticos, prebióticos e simbióticos	29
Tabela 3- Probióticos sintéticos na prevenção e tratamento de doenças em seres humanos	35

Abreviaturas

AGCCs - Ácidos gordos de cadeia curta

BL- *Bifidobacterium longum*

CU- Colite ulcerosa

DAA- Diarreia associada a antibióticos

DACD – Diarreia associada ao *Clostridium Difficile*

DC- Doença de Crohn

DII - Doença Inflamatória Intestinal

DNACD- Diarreia não associada ao *Clostridium Difficile*

EFSA- Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

FAO- Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

GOS- Galacto-oligossacarídeos

MAMPs- Componentes estruturais da superfície dos microrganismos

OMS- Organização Mundial da Saúde

PRR- Receptores de reconhecimento de padrões

QPS -Presunção Qualificada de Segurança

ROS- Espécies Reativas de Oxigénio

SOD- Superóxido dismutase

TGI- Trato Gastrointestinal

TMF- Transplante de microbiota fecal

I. Introdução

A co-evolução recíproca entre mamíferos e microrganismos intestinais durou centenas de milhões de anos. Atualmente, sabe-se que os seres humanos vivem em conjunto com inúmeros microrganismos existentes no exterior ou no interior do seu organismo, designadamente no intestino (Davenport *et al.*, 2017). A microbiota intestinal humana é definida como a totalidade dos microrganismos presentes na superfície epitelial do trato gastrointestinal (TGI) humano (Linares *et al.*, 2016). A microbiota humana, especialmente a microbiota intestinal, é considerada um "órgão essencial" que integra aproximadamente 150 vezes mais genes do que os encontrados no genoma humano (Wang *et al.*, 2017a). A interrogação sobre as características e os mecanismos subjacentes a essa relação fez emergir conhecimentos que, ao longo do tempo, têm sublinhado a relevância do microbioma humano na manutenção da saúde e no desenvolvimento de doenças (Davenport *et al.*, 2017).

Desde a antiguidade, os seres humanos têm procurado inventar tecnologias que aprimorem ou ampliem a sua capacidade de sobrevivência e adaptação a condições ambientais, permitindo superar o seu desempenho e alcançar os objetivos. Atualmente, apesar da composição da microbiota intestinal não ser totalmente conhecida, é evidente o crescente interesse nesta área científica. Os avanços técnico-científicos registados nos últimos anos disponibilizaram novas técnicas de investigação e métodos biomoleculares que têm permitido detetar e caracterizar mais aprofundadamente o microbioma humano (Karamanou *et al.*, 2017).

Nessa medida, a relação entre flora intestinal e saúde tem suscitado um interesse crescente que visa, nomeadamente, a identificação de novas formas de prevenção e de tratamento de diversas doenças. De facto, com o aparecimento de microrganismos multirresistentes e o esgotamento de opções de tratamento dependentes do uso de antibióticos, torna-se urgente criar métodos alternativos para combater esses microrganismos patogénicos que frequentemente estão associados a doenças com elevadas taxas de morbilidade e/ou mortalidade (Chua *et al.*, 2017). Deste modo, a manutenção da microbiota através do uso de probióticos, prebióticos e simbióticos tem suscitado um interesse crescente. Os probióticos são considerados microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (Capurso, 2016; Mizock, 2015). As culturas probióticas competem

pela colonização da mucosa intestinal, produzem substâncias bacteriostáticas e estimulam a proliferação de bactérias benéficas para o hospedeiro. A sua utilização com fins preventivos e terapêuticos é, por isso, atrativa (Cremon *et al.*, 2018). Adicionalmente, o aparecimento da biologia sintética tem permitido desenvolvimentos ao nível da engenharia de microorganismos e de probióticos comensais e, subsequentemente, possibilitar a intervenção na microbiota através da modulação das suas funções terapêuticas. Ao longo dos anos, os cientistas têm projetado probióticos para combater doenças de etiologia muito diversa (Chua *et al.*, 2017).

Atualmente é indiscutível a associação entre o microbioma intestinal e a saúde humana. Esta noção tem influenciado decisivamente o interesse, cada vez maior, sobre probióticos naturais e sintéticos, e o seu papel na saúde pública. Neste contexto, este trabalho tem como principal objetivo auxiliar e esclarecer, através de uma revisão bibliográfica, a relação entre os microrganismos e o ser humano descrevendo, para isso, de forma detalhada e integrada a composição e os fatores que influenciam a microbiota intestinal.

II. Metodologia

O presente estudo representa uma revisão dos conhecimentos sobre o tema proposto. Nesse sentido, foi realizada uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos, redigidos em português ou em inglês, em bases de dados científicas digitais, designadamente Pubmed, Medline e Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal utilizando os termos “microbioma”, “microbiota”, “epigenoma e microbiota intestinal”, “probióticos”, “prebióticos”, “simbióticos”, “probióticos e mecanismo de ação”, “probióticos e utilização clínica”, “probióticos em crianças”, “engenharia do microbioma” e “designer probióticos”, reportada ao período compreendido entre 2013 e 2019. Após a leitura do resumo dos artigos selecionados, foram escolhidos os mais relevantes e atuais para alcançar os objetivos propostos.

III. Desenvolvimento

3.1. Probióticos: perspectiva histórica

Desde o século XVII que é generalizada a ideia de que o corpo humano é habitado por inúmeros e distintos microrganismos. As bactérias eram consideradas seres “invasores” e potenciais agentes infecciosos. No domínio da Microbiologia, a investigação estava essencialmente focada no desenvolvimento de diversos antibióticos e desinfetantes pois tinha por objetivo principal a eliminação de bactérias prejudiciais ao organismo (Linares *et al.*, 2016; van der Meulen *et al.*, 2016).

No caso dos microrganismos presentes no intestino humano presumia-se que fossem organismos comensais, isto é, não prejudiciais mas inúteis para o hospedeiro humano (Butel, 2014). Hoje em dia reconhece-se que a interação simbiótica entre esses microrganismos e o Homem é de natureza complexa e tem impacto na fisiologia humana. Por essa razão, a utilização de microrganismos vivos para a manutenção da saúde humana tem registado um interesse crescente, tanto no domínio da prevenção como do tratamento de doenças específicas. De facto, cada ser humano é colonizado com triliões de bactérias e o corpo humano pode, portanto, ser tratado como um "superorganismo", isto é, um organismo feito de muitos organismos menores, que agem em conjunto para produzir processos fisiológicos benéficos para ambas as partes (Butler *et al.*, 2019).

Estima-se que a microbiota intestinal humana, composta por aproximadamente 10 a 100 trilhões de microrganismos, exceda em número as células do corpo humano por um fator de dez (Figura 1) (Li *et al.*, 2016). Atualmente, dada a sua relevância na saúde humana, alguns autores consideram o microbioma como um "órgão" adicional, não menos crucial para a saúde humana do que o estômago ou baço (Dou e Bennett, 2017).

Durante os últimos 10 anos, os desenvolvimentos registados ao nível das técnicas de sequenciação de DNA permitiram melhorar significativamente a compreensão sobre a composição das populações microbianas que habitam não só o intestino, mas também outros locais do corpo, tais como as vias aéreas superiores respiratórias, a pele, a boca ou a vagina (Sanchez *et al.*, 2017).

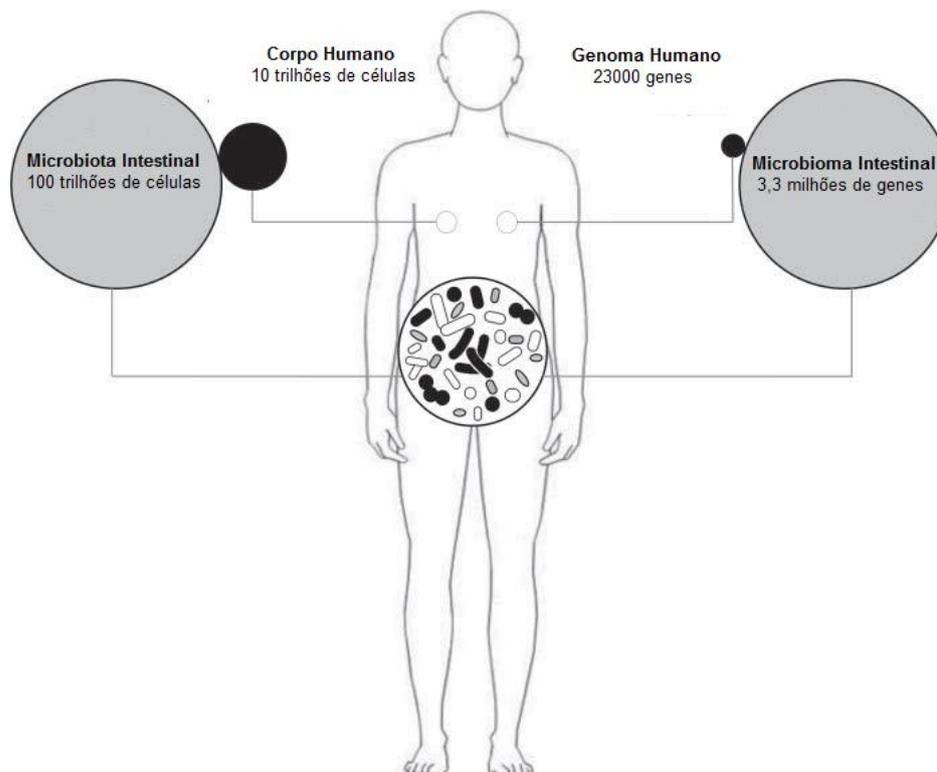


Figura 1- Complexidade genética e celular do Microbioma Intestinal

Extraída de: (Linares *et al.*, 2016)

Os probióticos não são uma invenção, uma vez que fazem parte da composição dos alimentos tradicionais, como bebidas, peixe salgado, iogurtes e queijos. Contudo, a primeira definição de probiótico foi publicada por *Lily e Stillwell*, apenas em 1965. Os autores descreveram os probióticos como agentes microbiológicos que estimulam o crescimento de outros organismos (Sanchez *et al.*, 2017). O interesse crescente em estudar e desenvolver estes suplementos tem sido notório nos últimos anos. No banco de dados PubMed, o termo “probiótico” apareceu cerca de uma dúzia de vezes por ano nos anos 90, aumentando centenas de vezes por ano nos anos 2000. Atualmente são anexados milhares de artigos relacionados com este tema. Os probiótico que, até recentemente, eram associados, principalmente, ao domínio da Microbiologia e Agricultura, presentemente estão associados a áreas científicas muito diversas, tais como Odontologia, Imunologia, Gastroenterologia, Veterinária ou Farmacologia (Linares *et al.*, 2016). As principais linhas de ação são respeitantes à atividade sistémica dos probióticos e ao seu papel na melhoria do controlo de várias patologias (Capurso, 2016; Mizock, 2015).

3.2. Microbioma e microbiota

Do ponto de vista biológico, o microbioma humano pode ser considerado “*uma comunidade microbiana que ocupa um habitat razoavelmente bem definido, possuindo propriedades físico-químicas distintas*”(van der Meulen *et al.*, 2016). No entanto, na literatura científica, o termo surge também associado à Genética. Nesta área, o microbioma é visto como um “*conjunto de genomas dos microrganismos que vivem com o ser humano*” ou como um “*segundo genoma do hospedeiro*”, sendo que os próprios microrganismos são definidos como “*microbiotas*”. (Coburn e Guttman, 2015).

Nas últimas décadas, alguns projetos de investigação em larga escala, como o projeto Microbioma humano, analisaram a microbiota de um conjunto de nichos, incluindo a pele, a via oral, vaginal e cavidades nasais. Embora algumas destas vias sejam facilmente acessíveis, o TGI é o ambiente mais desafiador para a obtenção da amostra para estudo e caracterização das estirpes, pela abundância, complexidade e dinâmica da colonização (Lepage *et al.*, 2013). A maior parte dos estudos publicados na literatura visam, essencialmente, a análise da microbiota do intestino por ser o local onde existe maior densidade de bactérias (Gerasimidis *et al.*, 2014).

As funções da microbiota são diversas, sendo atualmente considerada um órgão virtual do corpo humano. Das principais funções destacam-se a síntese de aminoácidos e vitaminas, bem como a produção de energia a partir de hidratos de carbono. Também contribui para a integridade da parede intestinal protegendo contra seres patogênicos e coadjuvando a ação do sistema imunológico (Giorgetti *et al.*, 2015).

3.2.1. Composição

A composição da microbiota não é totalmente conhecida. No entanto, os avanços técnico-científicos registados mais recentemente têm permitido analisar a microbiota com maior sensibilidade e especificidade. Estima-se que o organismo humano seja colonizado por uma grande quantidade de microrganismos como fungos, bactérias e vírus, e que a maioria está localizada no TGI. O corpo humano contém cerca de 1000 espécies diferentes de bactérias que, coletivamente, possuem 150 vezes mais genes microbianos do que os encontrados no genoma humano (Mizock, 2015; Wang *et al.*, 2017a). Cerca de 90% da comunidade bacteriana no adulto pertence às divisões

Firmicutes (Gram positivas - 65%) e Bacteroidetes (Gram negativas - 25%), sendo que os anaeróbios dominam face aos aeróbios. Os gêneros anaeróbios mais relevantes incluem Bacteroides e Bifidobacterium (Marchesi *et al.*, 2016). Os filos Proteobacteria (incluindo *Escherichia coli*), Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia são encontrados com menos frequência na microbiota intestinal (Lange *et al.*, 2016). De salientar, ainda, a existência de uma elevada diversidade microbiana interindividual, uma vez que cada ser humano possui um padrão bacteriano exclusivo, o qual é determinado pelo genótipo do hospedeiro (Li *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017a).

A distribuição da microbiota ao longo do trato digestivo não é uniforme: é muito baixa no estômago devido à ação bactericida do ácido clorídrico, aumentando gradualmente no intestino delgado e atingindo concentrações muito altas no cólon, onde é representada principalmente por bactérias anaeróbias gram-negativas (Figura 2) (de Almada *et al.*, 2015; Giorgetti *et al.*, 2015).

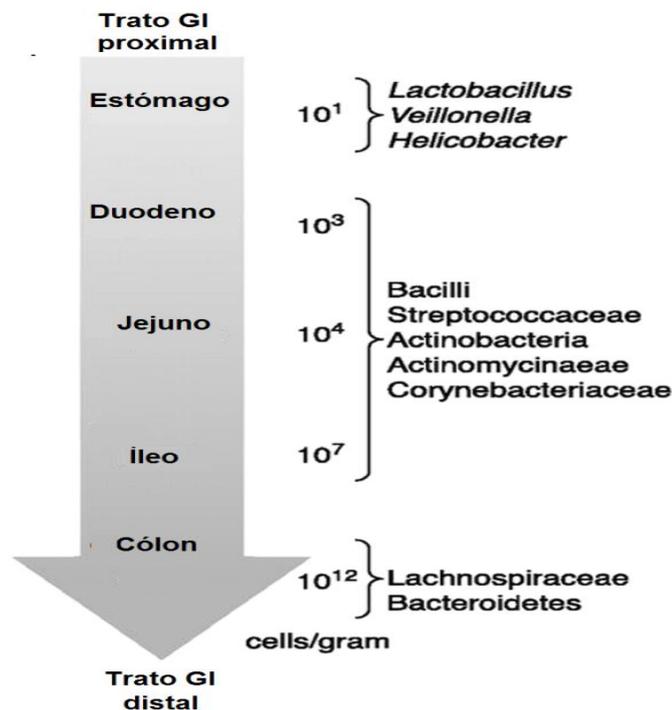


Figura 2: Composição da microbiota intestinal

Adaptada de: (de Almada *et al.*, 2015)

3.2.2. Relação com o hospedeiro

Num indivíduo saudável, a microbiota intestinal mantém uma relação simbiótica com a mucosa intestinal cooperando ao nível de funções metabólicas, imunológicas e protetoras (Jandhyala *et al.*, 2015). Nesta relação, o ser humano fornece à microbiota todos os nutrientes e condições indispensáveis à sua sobrevivência e crescimento, e os microrganismos retribuem com o desempenho de funções fundamentais ao desenvolvimento e manutenção da saúde do hospedeiro (de Almada *et al.*, 2015). Desta forma, a microbiota pode ser considerada como um elemento ativo na fisiologia gastrointestinal, desempenhando um papel chave na funcionalidade deste sistema (Kim *et al.*, 2016). Nesta relação simbiótica com o hospedeiro, a microbiota desempenha inúmeras funções tais como (Barroso, 2014):

- Ocupação de locais por bactérias comensais de forma a evitar a colonização da pele e mucosas por bactérias patogénicas (antagonismo bacteriano);
- Produção de mucina, de modo a formar uma barreira que diminui a capacidade de adesão de bactérias patogénicas;
- Produção de ácidos gordos pelas bactérias comensais existentes na pele, prevenindo o aparecimento de espécies indesejáveis;
- Produção de substâncias com actividade antibacteriana no intestino (bacteriocinas), ajudando desta forma a prevenir a colonização de bactérias patogénicas;
- Produção de nutrientes tal como a vitamina B e K, sendo esta última essencial para a síntese de vários fatores de coagulação;
- Metabolismo de drogas

Os microrganismos do intestino podem coexistir simbioticamente com um humano saudável. Os Ácidos gordos de cadeia curta (AGCC's) são produtos de fermentação de fibras alimentares produzidas por microrganismos intestinais. Embora essas fibras sejam indigestas por humanos, os seus metabolitos fornecem nutrientes essenciais para as células do cólon e desempenham um papel importante na manutenção da saúde intestinal (Wang *et al.*, 2017b). Vários estudos relatam que a disbiose do intestino pode estar associada à patogénese de várias doenças (Kim *et al.*, 2016).

3.2.3. Fatores influenciadores

Ao longo da vida de um ser humano, são vários os fatores que podem alterar a flora intestinal humana, dos quais se destacam: a Nutrição, o Microbioma e o Epigenoma (Figura 3). Estes fatores são desenvolvidos nas secções seguintes do presente trabalho.

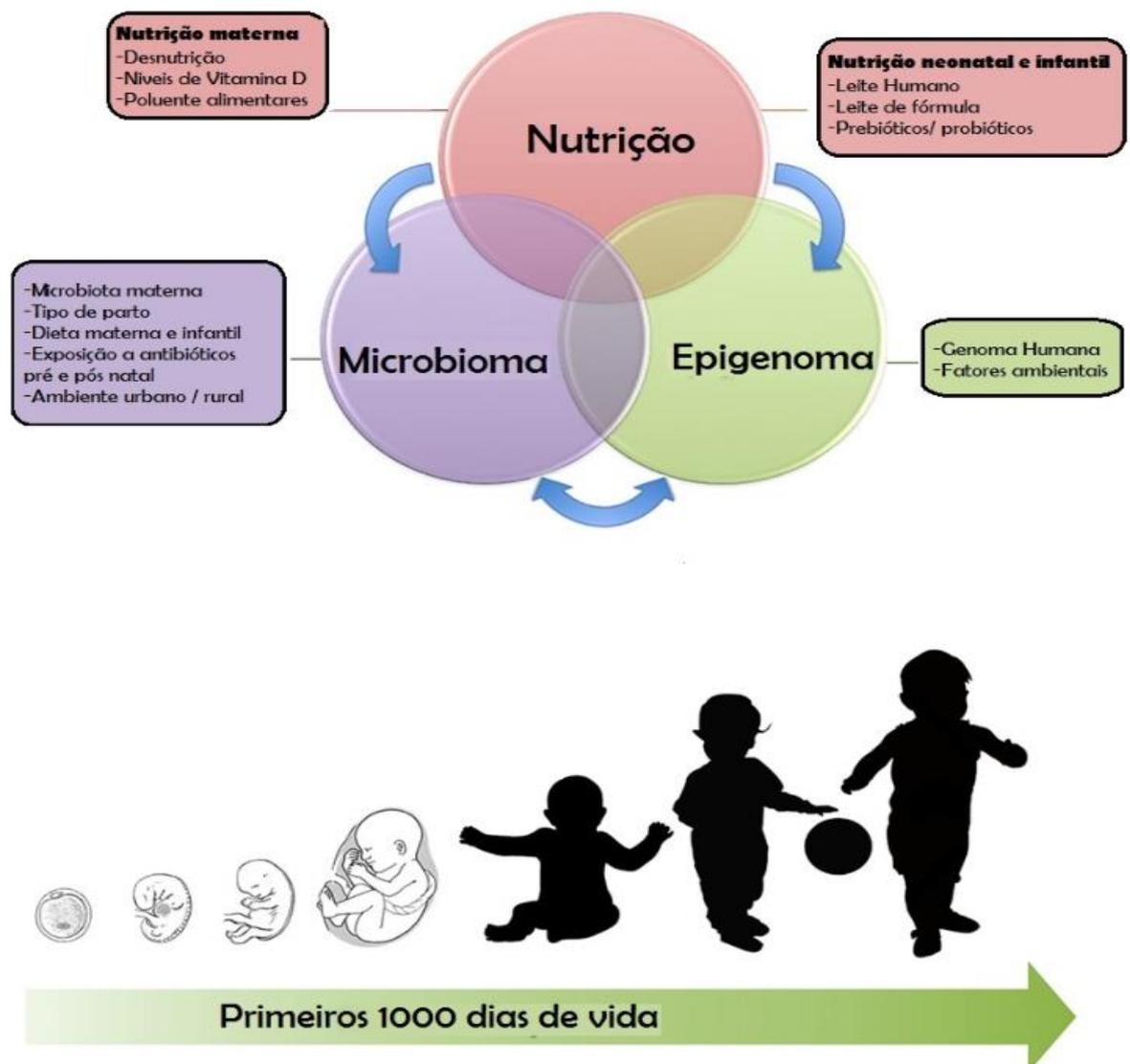


Figura 3- Fatores influenciadores da microbiota intestinal

Adaptada de: (Indrio *et al.*, 2017)

3.2.3.1. Idade

Os seres humanos desde que nascem, estão em constante mudança e a microbiota, que faz parte integrante da biologia do hospedeiro, encontra-se igualmente em coevolução (Borre *et al.*, 2014). A composição da microbiota intestinal é variável ao longo da vida do ser humano (Figura 4) (Nagpal *et al.*, 2018). A literatura faz referência à associação da microbiota com o desenvolvimento de perturbações psiquiátricas em vários períodos durante a vida do ser humano, nomeadamente a gestação, parto, infância, adolescência e a velhice (Borre *et al.*, 2014).

Efetivamente, durante o parto ocorre a colonização por inúmeros microrganismos que irão desempenhar um papel crucial na definição da futura identidade fisiológica e imunológica estando, subsequentemente, implicados na saúde e doença do ser humano (Blottiere *et al.*, 2013). O tipo de parto afeta o desenvolvimento da comunidade bacteriana do TGI. Os bebés que nascem por parto normal apresentam uma colonização precoce e enriquecida de *Lactobacilos*, *Bacteroides* e *Prevotella*, adquiridos da microbiota vaginal e fecal materna durante o parto. Já os bebés que nascem por cesariana apresentam colonização pobre em *Bacteroides*, *Bifidobactérias*, sendo frequentemente colonizados por *Clostridium difficile*, *C. perfringens* e *Escherichia* (Jandhyala *et al.*, 2015; Nagpal *et al.*, 2018). Vários estudos referem que os bebés que nascem por cesariana parecem ser mais susceptíveis a agentes patogénicos e ao desenvolvimento de alergias, doenças inflamatórias crónicas e doenças metabólicas, sugerindo que os microrganismos vaginais desempenhem um papel protetor contra a colonização por agentes patogénicos (Chernikova *et al.*, 2019; Jagodzinski *et al.*, 2019; Jandhyala *et al.*, 2015).

Durante vários anos foi consensual a ideia de que o primeiro contacto do ser humano com microrganismos ocorria durante o parto. No entanto, estudos recentes relatam a presença de bactérias na placenta, na cavidade amniótica e no cordão umbilical, sugerindo que o processo colonização da microbiota infantil poderá iniciar-se no útero (Li *et al.*, 2016; Nagpal *et al.*, 2018). O contacto com microrganismos no ambiente intra-uterino poderá estar implicado no desenvolvimento do sistema imunológico e esta hipótese tem despertado um interesse progressivamente crescente pelo estudo da flora intestinal durante a gravidez (Jagodzinski *et al.*, 2019)

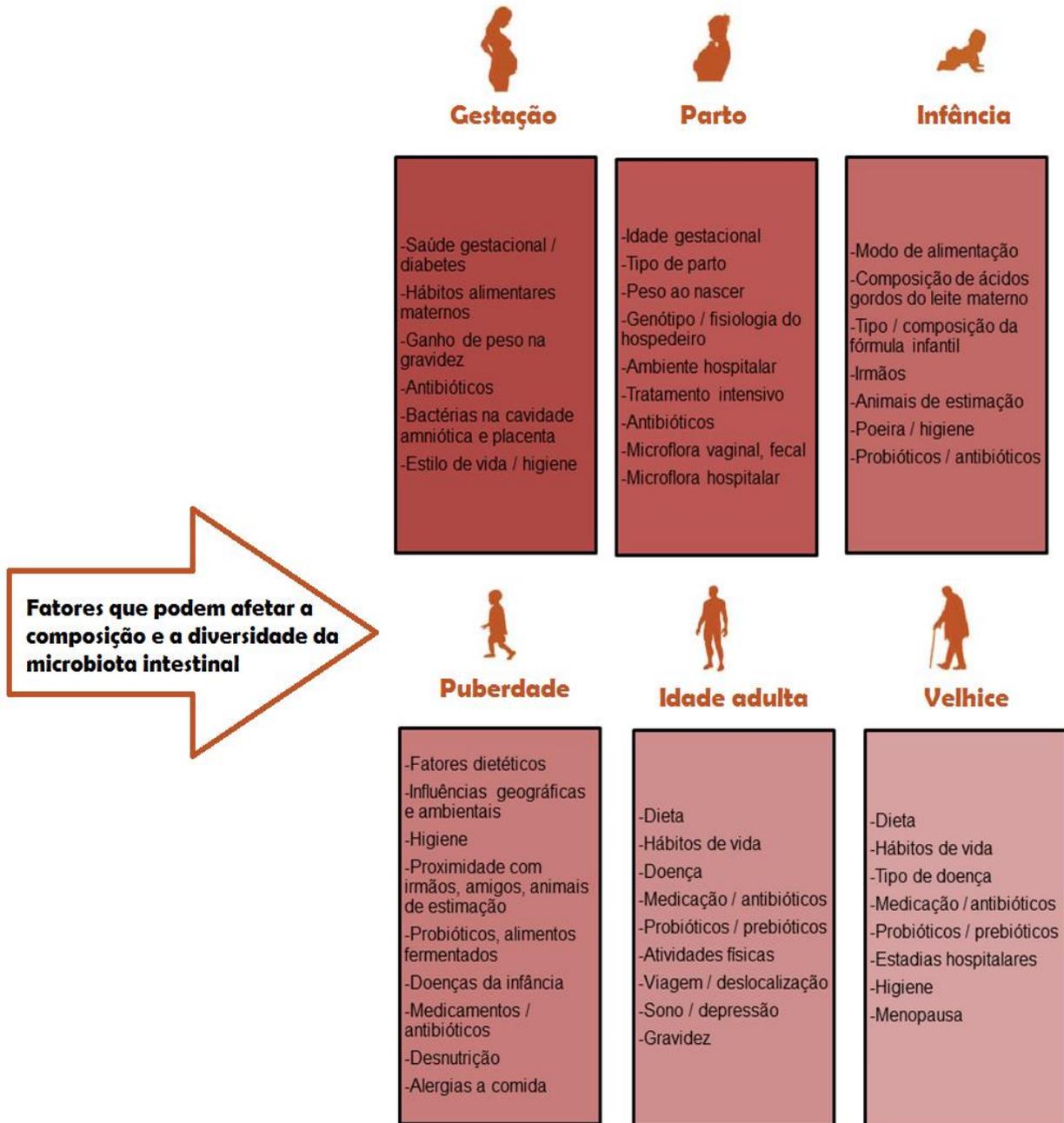


Figura 4- Fatores que afetam a microbiota intestinal ao longo da vida

Adaptada de: (Nagpal *et al.*, 2018)

Durante a infância, especialmente durante os primeiros três anos de vida, estabelece-se uma estrutura relativamente estável, semelhante à da microbiota adulta. Os idosos apresentam uma microbiota intestinal distinta dos adultos saudáveis (Nagpal *et al.*, 2018). Essa diferença pode ser atribuída a vários elementos e fatores (Figura 4) que serão a seguir desenvolvidos. Geralmente, a diversidade da microbiota intestinal e o transporte de comensais, como *bacteroides*, *bifidobactérias* e *lactobacilos* estão reduzidos nos idosos comparativamente a indivíduos mais jovens. Já os níveis de oportunistas, como *Enterobactérias*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*, parecem estar aumentados nesta faixa etária. Esta condição poderá ser uma das causas que favorecem estados patológicos nos idosos. Os microrganismos intestinais não envelhecem. Porém, as comorbidades associadas às alterações da microbiota intestinal tendem a aumentar à medida que o hospedeiro envelhece (Dou e Bennett, 2017; Jandhyala *et al.*, 2015).

3.2.3.2. Dieta

No que concerne à alimentação, o impacto da dieta sobre a microbiota tem sido cada vez mais estudado, uma vez que a microbiota intestinal é reconhecida como uma parte importante do sistema digestivo humano e desempenha um papel fundamental na nutrição (Gomez-Gallego *et al.*, 2019).

Após o nascimento, o tipo de alimentação (amamentação ou alimentação com fórmula) molda diretamente a composição da microbiota. O leite materno contém vários compostos bioativos que não estão disponíveis no leite de fórmula. Estes compostos têm um papel significativo na digestão e absorção de nutrientes, na proteção imunológica e na defesa antimicrobiana. Vários estudos relatam uma diferença considerável entre os bebês amamentados e os bebês alimentados com leite de fórmula. Os oligossacarídeos do leite humano fornecem nutrição para as bactérias do cólon do bebê, proporcionando uma vantagem seletiva de crescimento para *Bifidobacterium spp.* Estes organismos fermentam oligossacarídeos dietéticos, que são benéficos para a saúde. Já as crianças alimentadas com leite de fórmula apresentam abundância de organismos anaeróbicos como o *Bacteroides sp.* e *Clostridium sp.* (Jandhyala *et al.*, 2015).

A transição de uma dieta à base de leite para a introdução de alimentos sólidos (período de alimentação complementar) é acompanhada pela transformação da composição da microbiota intestinal. Apesar da microbiota adquirir uma configuração próxima da adulta durante os primeiros anos de vida, a dieta ao longo da vida desempenha um papel muito importante na sua formação e manutenção. Um estudo dirigido por *Sonnenburg* e colaboradores, em 2016, demonstrou que uma dieta moderna pobre em fibras pode ser responsável pela microbiota de menor diversidade, explicando o aumento de distúrbios intestinais registados nos países ocidentais (McCarville *et al.*, 2016; *Sonnenburg et al.*, 2016).

Diversos estudos indicam ainda que nas dietas ricas em fibras e vegetais, tais como a dieta mediterrânica, ocorre um aumento do nível dos filos *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*, e uma diminuição do filo *Firmicutes*, ao contrário do que acontece nas dietas ocidentais, ricas em gorduras. Em geral, a ingestão de uma dieta mediterrânea está associada a uma maior riqueza e diversidade da microbiota intestinal, uma vez que os indivíduos que consomem esse tipo de dieta têm uma maior abundância de organismos metabolizadores de carboidratos insolúveis (Jandhyala *et al.*, 2015).

3.2.3.3. Antibióticos

Apesar dos benefícios dos antibióticos contra organismos patogénicos, nos últimos anos vários estudos têm analisado o efeito dos antibióticos sobre a ecologia bacteriana intestinal. Atualmente sabe-se que o uso de antibióticos tem várias implicações a curto e a longo prazo uma vez que os genes bacterianos que conferem resistências a vários medicamentos prevalecem por milhares de anos influenciando, assim, a exposição a pequenas moléculas do ambiente com propriedades inibidoras de crescimento (Jandhyala *et al.*, 2015). O tratamento antibiótico a curto prazo é capaz de mudar a microbiota intestinal para estados disbióticos, o que pode promover o desenvolvimento e o agravamento da doença. A interação entre a imunidade intestinal e a microbiota contribui para a patogénese e gravidade de doenças metabólicas, autoimunes, infecciosas e cancro. No entanto, o espectro de ação do antibiótico, a dosagem, a duração do tratamento e a via pela qual é administrado são factores que podem influenciar a forma como os antibióticos alteram a microbiota intestinal (Lange *et al.*, 2016).

3.2.3.4. Genoma Humano e Epigenoma

Em 2007, o Projeto Microbioma Humano foi anunciado como uma extensão lógica conceptual e experimental do Projeto Genoma Humano. Um dos principais objetivos do projeto foi investigar o conceito de um microbioma humano (van der Meulen *et al.*, 2016).

O genoma representa a totalidade de informação genética de um organismo armazenada na molécula de DNA. As bactérias desempenham funções compartilhadas na expressão génica. Por isso, identificar os microrganismos que habitam o corpo humano é considerado como uma expedição para um sistema desconhecido que está intrinsecamente relacionado com evolução e desenvolvimento da espécie humana (Gadecka e Bielak-Zmijewska, 2019).

O termo epigenética, que literalmente significa “no topo da genética”, define uma variedade de processos que causam alterações na expressão génica sem modificar a sequência do DNA. As modificações epigenéticas estão entre os mecanismos mais importantes pelos quais os fatores ambientais podem influenciar a diferenciação celular precoce e criar novas características fenotípicas, designadamente durante a gravidez e no período neonatal. (Indrio *et al.*, 2017). A metilação do DNA, a modificação de histonas e o RNA não-codificante são os principais mecanismos subjacentes às modificações epigenéticas (Gadecka e Bielak-Zmijewska, 2019; Leso *et al.*, 2019). Os dois primeiros serão a seguir analisados por serem os mecanismos epigenéticos originalmente descritos e, por isso, tradicionalmente analisados.

Metilação do DNA

A modificação epigenética mais comum é a metilação do DNA. Esta modificação resulta da adição de um grupo metilo à citosina de um par citosina-guanina. Se essa metilação estiver localizada próxima de um gene, pode resultar na diminuição ou supressão da expressão genética. Como o metabolismo do carbono depende de doadores de grupos metilo provenientes, nomeadamente, da dieta, a metilação do DNA pode ser influenciada pela nutrição ao longo da vida. Este processo envolve um grande número de enzimas com atividade metiltransferase, alguns cofatores como a colina, a metionina, vitaminas B6 e B12, zinco, betaína e micronutrientes dietéticos como doadores de metilo (Gadecka e Bielak-Zmijewska, 2019).

Modificação de histonas

As histonas são proteínas de ligação ao DNA altamente conservadas que formam a unidade de repetição da cromatina e que é designada por nucleossoma. Cada nucleossoma é constituído por duas cópias de histonas H2A, H2B, H3 e H4. O DNA de cadeia dupla linear é enrolado neste octâmero de histonas e uma quinta histona, a histona H1, interacciona com o DNA de ligação entre os núcleos de nucleossomas adjacentes. As histonas podem apresentar modificações pós-traducionais e as mais prevalentes são a metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação. A acetilação das histonas resulta na descondensação da cromatina, possibilitando, assim, que fatores de transcrição possam aceder mais facilmente à região do DNA que deverá ser transcrita; por outro lado, a desacetilação ocasiona a compactação da cromatina e consequentemente a repressão da transcrição. Já a metilação pode tanto ativar, quanto reprimir, dependendo da posição do resíduo de aminoácido que foi modificado e do número de grupos metilo adicionados. Assim, dependendo do tipo de modificação, o impacto no nível de expressão génica pode variar consideravelmente (Cuevas-Sierra *et al.*, 2019)

Atualmente, há evidências crescentes sobre a capacidade de vários metabolitos microbianos interagirem com processos epigenéticos. Essas modificações epigenéticas podem levar à reprogramação do genoma do hospedeiro, alterando o processo transcricional da célula em resposta a estímulos ambientais. Na infância, os mecanismos epigenéticos podem estar relacionados com a colonização e o desenvolvimento da microbiota intestinal sob a influência de fatores externos já descritos anteriormente (tipo de parto, amamentação, introdução de alimentos sólidos e tratamentos com antibióticos) (Cuevas-Sierra *et al.*, 2019). Esses fatores podem contribuir para o estabelecimento de alterações epigenéticas que podem não apenas modular a adaptação individual ao ambiente, mas também influenciar a saúde ao longo da vida, modificando as vias moleculares inflamatórias e a resposta imune (Indrio *et al.*, 2017).

A microbiota intestinal produz uma infinidade de metabolitos que afetam a fisiologia do hospedeiro e a suscetibilidade a doenças. Vários estudos constataram que os AGCC's inibem a atividade da histona desacetilase. Um estudo dirigido por *Krautkramer* e seus colaboradores, em 2016, constatou que a microbiota intestinal afeta os estados epigenéticos do tecido hospedeiro. Nesse estudo demonstrou-se que a colonização

microbiana regula a acetilação e metilação globais de histonas em vários tecidos hospedeiros de uma maneira dependente da dieta, sendo que o consumo de uma dieta do tipo da dieta ocidental parece impedir algumas das alterações da cromatina dependentes da microbiota (Cuevas-Sierra *et al.*, 2019; Krautkramer *et al.*, 2016).

3.3. Probióticos, prebióticos, simbióticos

3.3.1. Definição

Probiótico

O termo probiótico é derivado de uma palavra grega que significa vida e é usado para referir organismos vivos não patogênicos com efeitos benéficos nos hospedeiros (Pandey *et al.*, 2015).

Desde a antiguidade que os produtos fermentados contendo microrganismos vivos são usados para manter ou restabelecer a saúde. A imunologista Elie Metchnikoff propôs, em 1908, que consumir o leite fermentado contendo lactobacilos poderia remover organismos intestinais putrefativos e patogênicos, e aumentar a longevidade (Nami *et al.*, 2015; Sanchez *et al.*, 2017). Contudo, o termo “probiótico” só foi definido em 1965, quando Lilly e Stillwell, num artigo científico, definem probióticos como "*fatores promotores de crescimento produzidos por microrganismos*". A primeira definição de probióticos, dentro do conceito iniciado por Metchnikoff, foi a de Parker, em 1974, que definiu os probióticos como "*organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal*". Décadas mais tarde, Fuller propôs a definição de probióticos como "*suplementos alimentares microbianos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o seu equilíbrio microbiano intestinal*". Todas essas definições têm em comum o efeito benéfico dos probióticos sobre a microbiota intestinal. No entanto, um número crescente de estudos científicos tem também demonstrado a inexistência de um efeito benéfico entre o consumo de probióticos e a microbiota intestinal estabelecendo, deste modo, a controvérsia sobre a definição a adotar (Doron e Snyderman, 2015; Markowiak e Slizewska, 2017; Sanchez *et al.*, 2017; Syngai *et al.*, 2016).

Só em 2001, surgiu um consenso na definição de probióticos. O termo “probiótico”, tal como definido originalmente pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) / Organização Mundial da Saúde (OMS), tem a seguinte redação: “*microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro*” (Kumar *et al.*, 2015; Syngai *et al.*, 2016).

Os probióticos podem ser incluídos na composição de uma vasta gama de produtos, que varia entre medicamentos e suplementos alimentares, mas encontram-se frequentemente associados a laticínios. Neste caso, as espécies *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* e *Saccharomyces* são as espécies mais vulgarmente utilizadas como probióticos (Tabela 1).

Tabela 1- Microrganismos probióticos utilizados em suplementos alimentares

Adaptado de: (Markowiak e Slizewska, 2017)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias do ácido láctico	Outros microrganismos
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (<i>boulardi</i>)
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. helveticus</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. pentosus</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

A FAO e a OMS apresentaram, em conjunto, directrizes para o estabelecimento de uma abordagem sistemática que permitisse uma avaliação eficaz dos benefícios para a saúde decorrentes da presença de probióticos nos alimentos (Pandey *et al.*, 2015). Alguns dos pré-requisitos de um organismo probiótico ideal estão descritos na Figura 5.

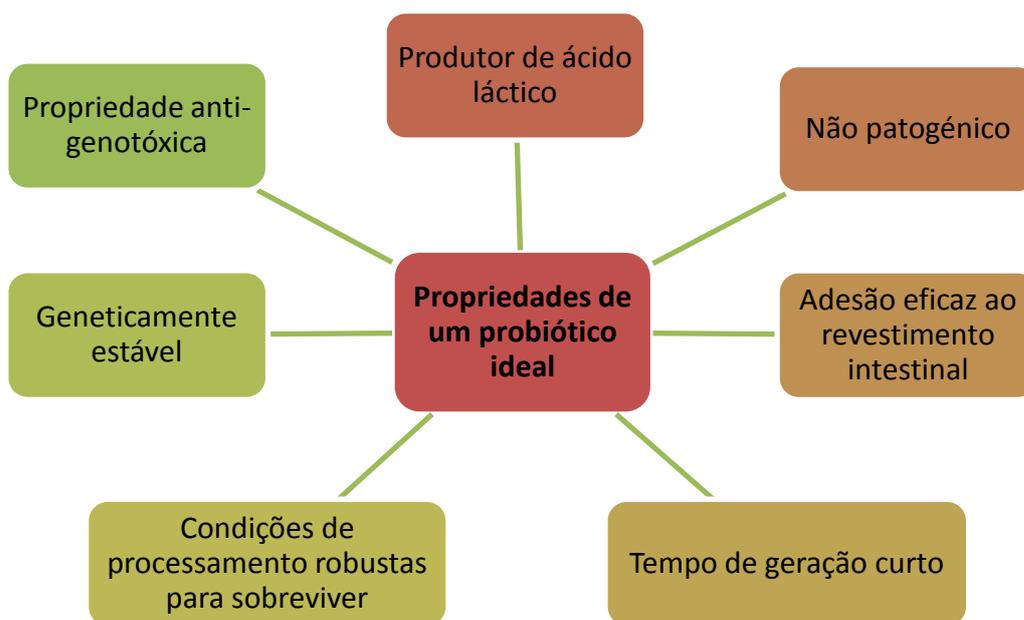


Figura 5- Características de um probiótico ideal

Adaptado de: (Daliri e Lee, 2015; Pandey *et al.*, 2015)

Os probióticos estão sujeitos aos regulamentos contidos na lei geral dos alimentos, segundo a qual eles devem ser seguros para a saúde humana e animal. Nos EUA, os microrganismos usados para fins de consumo são regulamentados pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) e devem ter a classificação GRAS (geralmente considerado como seguro). Na Europa, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) introduziu o termo QPS (Presunção Qualificada de Segurança). O conceito QPS envolve alguns critérios adicionais de avaliação de segurança de suplementos bacterianos, incluindo o histórico de uso seguro e a ausência do risco de resistência adquirida aos antibióticos (Markowiak e Slizewska, 2017).

Prebióticos e simbióticos

O conceito de prebiótico foi formalmente introduzido no ano de 1995 por Glenn Gibson e Marcel Roberfroid com a seguinte definição: “*ingredientes nutricionais não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas do cólon, melhorando a saúde do seu hospedeiro*”(Hutkins *et al.*, 2016; Markowiak e Slizewska, 2017).

No 6º Encontro da Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos em 2008, a definição de prebióticos foi atualizada e tem a seguinte redação: “*um ingrediente fermentado seletivamente que resulta em alterações específicas na composição e / ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefício (s) à saúde do hospedeiro*”. Com base nessa definição, os prebióticos podem exercer benefícios não apenas no cólon, mas também noutros locais, designadamente cavidade oral, trato urogenital e pele (Hutkins *et al.*, 2016; Valcheva e Dieleman, 2016). Mais tarde, Bindels e colaboradores propuseram uma definição mais ampla de prebióticos desviando o foco para as características ecológicas e funcionais da microbiota. Um prebiótico pode ser, então, definido como um composto não digerível que, através da sua metabolização por microrganismos no intestino, modula a composição e a atividade da microbiota intestinal, conferindo assim um efeito fisiológico benéfico ao hospedeiro (Valcheva e Dieleman, 2016).

Relativamente à composição, os prebióticos consistem essencialmente em hidratos de carbono, nomeadamente, oligossacáridos e polissacáridos que não são digeríveis pelas enzimas intestinais e que conferem vantagens, principalmente o crescimento e/ou a actividade de bactérias benéficas. Algumas fontes de prebióticos incluem leite materno, soja, fontes de inulina, aveia crua, trigo não refinado, cevada não refinada, carboidratos não digeríveis e, em particular, oligossacarídeos não digeríveis. No entanto, entre os prebióticos, apenas os oligossacarídeos bifidogénicos não digeríveis como a inulina, o seu produto de hidrólise (oligofrutose) e os galacto-oligosacarídeos (GOS) cumprem todos os critérios para a classificação de um prebiótico (Hutkins *et al.*, 2016). Outros compostos, tais como amidos resistentes, pectina, arabinoxilana, grãos integrais e polifenóis também têm sido considerados prebióticos (Pandey *et al.*, 2015).

Um prebiótico ideal deve cumprir alguns atributos desejáveis, dos quais se salienta (Pandey *et al.*, 2015):

- Ativo numa baixa dosagem
- Falta de efeitos colaterais
- Persistência através do cólon
- Viscosidade variável
- Estabilidade aceitável de armazenamento e processamento
- Capacidade de controlar a modulação da microflora
- Doçura variável

A combinação sinérgica de prebiótico com probiótico é denominada por simbiótico. Ou seja, um simbiótico exerce em simultâneo o efeito de prebiótico e probiótico (Mizock, 2015). Um produto simbiótico afeta benéficamente o hospedeiro na melhoria da sobrevivência e implantação de suplementos alimentares microbianos vivos no trato gastrointestinal, estimulando seletivamente o crescimento e ativando o metabolismo de bactérias promotoras da saúde (Pandey *et al.*, 2015).

Hoje em dia, os probióticos, prebióticos e simbióticos são utilizados em áreas muito diversas, tais como ginecologia, urologia, antienvhecimento, gastroenterologia, imunologia, cardiologia, cuidados com a pele, dietética e higiene bucal, estando disponíveis comercialmente sob várias formas, incluindo alimentos, suplementos alimentares e agentes terapêuticos (Markowiak e Slizewska, 2017).

3.3.2. Mecanismos de ação

Estudos moleculares e genéticos têm contribuído para a compreensão dos efeitos benéficos dos probióticos através da elucidação dos seus mecanismos de ação (Figura 6).

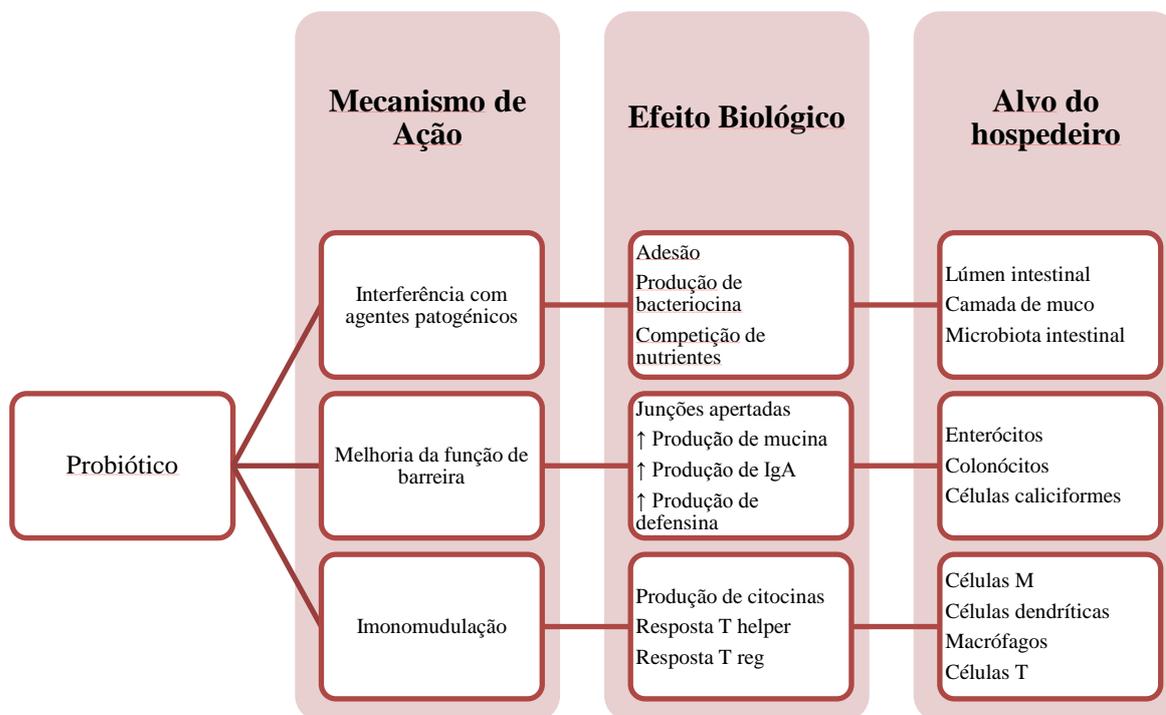


Figura 6- Mecanismo de ação dos probióticos

Adaptado de: (Sanchez *et al.*, 2017)

Efeito Antimicrobiano

Algumas bactérias probióticas específicas têm propriedades antimicrobianas, geralmente associadas à secreção de peptídeos ou moléculas, o que lhes permite competir dentro dos complexos ecossistemas intestinais. Essas moléculas podem proteger o hospedeiro contra bactérias infecciosas e favorecer a sobrevivência de bactérias comensais através da lesão direta ou indireta dos microrganismos patogênicos (La Fata *et al.*, 2017).

Os probióticos promovem a redução do pH do lúmen intestinal através da produção de ácidos orgânicos principalmente durante o metabolismo dos carboidratos, com

consequente inibição do crescimento de agentes patogénicos. Os principais ácidos orgânicos produzidos pelas espécies de *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* incluem: ácidos acético, butírico, propiônico e láctico. Nas suas formas não dissociadas, os AGCCs são antimicrobianos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, devido à sua lipofilicidade e à capacidade de solubilização das membranas celulares bacterianas (do Carmo *et al.*, 2018; Valcheva e Dieleman, 2016). São, por outro lado, capazes de lesar diretamente os microrganismos patogénicos através da produção de substâncias com atividade bacteriostática ou bactericida (Daliri e Lee, 2015; Reid, 2016). A estirpe 925A de *Lactobacillus brevis* influencia o sistema imunológico do intestino através da produção de uma bacteriocina identificada como brevicina 925A. Verificou-se que a brevicina 925A é eficaz contra *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus mutans*, que causam intoxicação alimentar e cárie dentária (La Fata *et al.*, 2017).

Melhoria da função Barreira

A integridade da barreira intestinal é um pré-requisito para a homeostase da função da mucosa que visa maximizar a capacidade de absorção enquanto mantém reações defensivas eficientes contra agentes químicos e microbianos. Existem evidências de que a ruptura da integridade da barreira epitelial é um dos principais fatores etiológicos associados a várias doenças gastrointestinais (Langdon *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2017).

Nesse sentido, os probióticos podem atuar na manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal pela sua capacidade de produção de muco, pelo aumento da expressão de genes codificadores das proteínas de junção e ainda pelo estímulo à produção de defensinas. Todas estas ações dificultam a disrupção da barreira intestinal promovendo, globalmente, a sua integridade (Langdon *et al.*, 2016).

Modulação do sistema imunitário e da resposta inflamatória

As bactérias intestinais regulam o sistema imunológico do hospedeiro e este, por sua vez, afeta a composição do microbioma intestinal. O sistema imunológico do hospedeiro é responsável por garantir uma composição benéfica da microbiota, controlando o crescimento excessivo de bactérias específicas, mas também reagindo a bactérias ou moléculas patogênicas da barreira intestinal (La Fata *et al.*, 2017).

A resposta imunitária é ativada pelo reconhecimento dos organismos estranhos, mediada por receptores específicos de células de imunidade inata como as células epiteliais, as células dendríticas e os macrófagos. Estes receptores são denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRR) e são reconhecidos por componentes estruturais da superfície dos microrganismos (MAMPs) que por sua vez interagem com o epitélio intestinal, estimulando as células do sistema imunitário intestinal ao nível da lâmina própria. As células T reguladoras são ativadas e diferenciam-se em linfócitos *Thelper*, o que induz a produção de citocinas pró ou anti inflamatórias (Plaza-Diaz *et al.*, 2019).

Efeito antioxidante dos probióticos

A microbiota intestinal protege o seu hospedeiro de agentes patogênicos por exclusão competitiva, incluindo ocupação de locais de fixação, consumo de fontes de nutrientes e produção de substâncias antimicrobianas. Quando a microbiota intestinal é alterada, bactérias nocivas podem proliferar excessivamente e simultaneamente desencadear stress oxidativo. Muitos outros fatores podem também desencadear, nos organismos, stress oxidativo, designadamente cigarros, herbicidas, nitrogénio, ozono e radiação. Durante as últimas décadas, vários estudos demonstraram que diferentes estirpes de bactérias probióticas podem exercer ação antioxidante por mecanismos diversos (Figura 7).

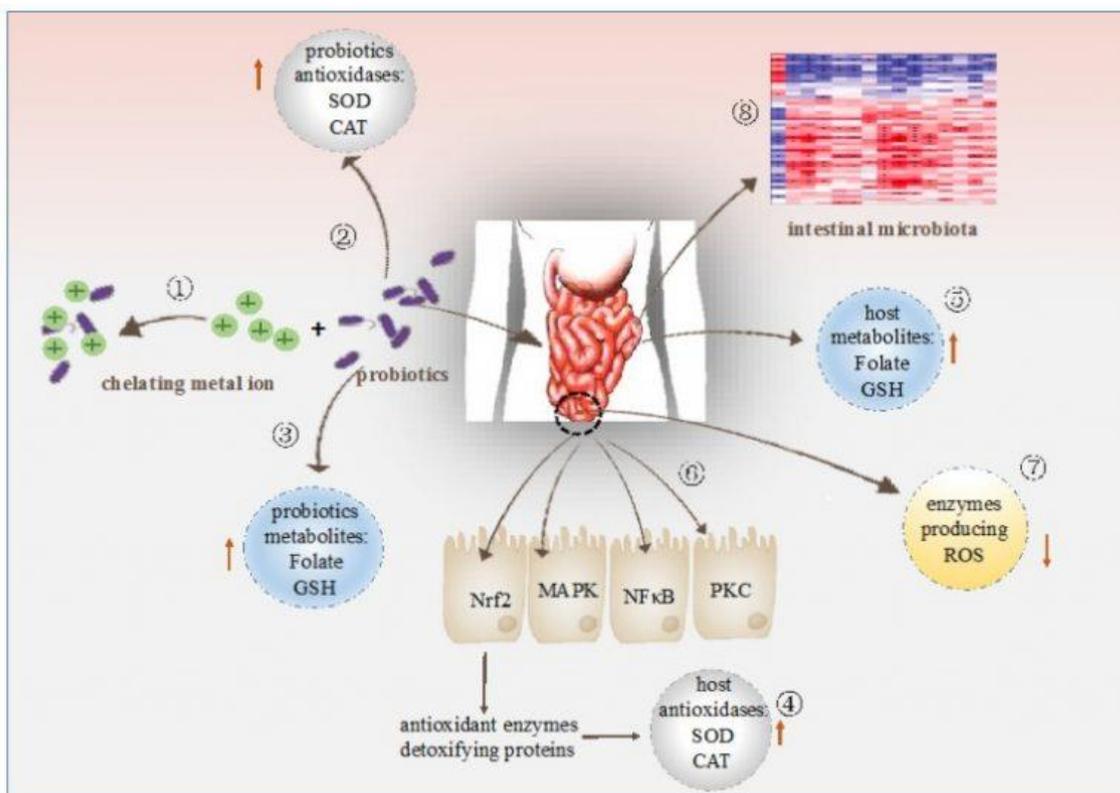


Figura 7 - Modulação da anti-oxidação por probióticos

Extraída de : (Wang *et al.*, 2017c)

Um dos sistemas enzimáticos antioxidantes observado em probióticos é a enzima superóxido dismutase (SOD). O anião superóxido é a espécie mais abundante produzida pela mitocôndria e a SOD catalisa a quebra do superóxido em peróxido de hidrogénio e água. Por esse motivo, esta enzima é considerada um regulador central dos níveis de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS) (Wang *et al.*, 2017c).

No entanto, a aplicação da SOD é limitada, principalmente devido à sua curta semi-vida circulatória que restringe a biodisponibilidade. Para resolver esta questão foi investigada a possibilidade de biodisponibilizar SOD através de veículos adequados. As bactérias probióticas capazes de fornecer localmente SOD representam uma nova abordagem para a prevenção e o tratamento de doenças do intestino associadas à produção de ROS (Ahire *et al.*, 2013). De facto, a produção de ROS é um fenómeno conservado entre os filos, representando um mecanismo através do qual as comunidades bacterianas podem afetar a homeostase redox no hospedeiro.

Embora a função dos probióticos na alteração da composição da microbiota intestinal tenha sido amplamente estudada, a caracterização do efeito antioxidante de probióticos sobre a composição da microbiota intestinal não está, ainda, bem elucidada e requer a realização de estudos adicionais (Mishra *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017c).

Outros mecanismos

Os probióticos poderão também ajudar na prevenção do cancro, através dos seus efeitos anticarcinogénicos. Alguns desses mecanismos, já descritos anteriormente, incluem a modulação do sistema imunológico e o reforço da barreira intestinal. No entanto, outros mecanismos alternativos têm sido propostos, tais como a atividade antimutagénica contra certos compostos químicos, ligação de compostos mutagénicos ou interação com enzimas bacterianas que ativam e/ou produzem compostos cancerígenos. Contudo, a sua eficácia deverá ser comprovada, no futuro, através da realização de ensaios clínicos em humanos (Markowiak e Slizewska, 2017).

3.3.3. Prevenção e tratamento de doenças

Os probióticos podem ser dirigidos a indivíduos saudáveis ou doentes, sendo que os seus efeitos podem ser de natureza preventiva ou curativa, combatendo a causa da doença ou alterações metabólicas específicas com vista à diminuição dos sintomas ou à sua progressão (Vandenplas *et al.*, 2015). Um número considerável de estudos tem analisado a utilidade dos probióticos na prevenção e/ou tratamento de condições clínicas específicas. As doenças para as quais existe maior evidência quanto aos benefícios da utilização de probióticos são: diarreia associada a antibióticos (DAA), diarreia infecciosa na infância e doença inflamatória intestinal (especialmente para manutenção da remissão na colite ulcerativa) (Mizock, 2015).

Diarreia associada a antibióticos

O uso de antibióticos tem aumentado constantemente na última década, estando entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. Os antibióticos interferem com o equilíbrio da microbiota intestinal tornando-a mais permissiva, o que facilita a invasão por microrganismos patogênicos (Mizock, 2015). O seu uso por, por isso, provocar distúrbios adicionais na flora intestinal, resultando em sintomas variados ao nível clínico (Issa e Moucari, 2014). A diarreia antibiótica inclui a forma associada ao *Clostridium difficile* (DACD) e a forma não associada ao *Clostridium difficile* (DNACD) (Mizock, 2015; Pandey *et al.*, 2015). A DNACD foi definida como uma diarreia benigna e autolimitada, surgindo após o uso de antimicrobianos orais, sendo que os sintomas podem começar 24 horas após a sua administração (Issa e Moucari, 2014; Vandenplas *et al.*, 2015). Em contrapartida, a diarreia por DACD refere-se a um amplo espectro de doenças, incluindo casos de colite grave, com ou sem a presença de pseudomembranas. A DACD é responsável por 10 a 25% da DAA, e a presença de uma estirpe hipervirulenta aumenta a gravidade da doença. A fisiopatologia do DACD resulta de uma perturbação da flora bacteriana normal do cólon, da colonização por *C. difficile* e da liberação de toxinas que danificam e inflamam a mucosa. O seu início pode ocorrer durante a antibioterapia ou 5 a 10 dias após a interrupção do antibiótico (Amara e Shibl, 2015; Mizock, 2015; Pandey *et al.*, 2015).

Na DAA, os probióticos auxiliam o restabelecimento do equilíbrio da microbiota intestinal e reforçam a estabilidade da barreira intestinal, prevenindo a sua disrupção e o aparecimento da diarreia (Varankovich *et al.*, 2015). De facto, os resultados de várias meta-análises têm demonstrado o benefício do uso de probióticos na DAA. Cremonini e colaboradores examinaram 7 ensaios clínicos randomizados e concluíram que houve uma redução estatisticamente significativa na DAA após a administração de probióticos (Islam, 2016). Outra metanálise dirigida por Hempel e colaboradores, em 2012, evidenciou também a eficiência da administração de probióticos no tratamento da DAA. Os microrganismos utilizados nesses estudos incluíram os géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Bacillus* (Issa e Moucari, 2014; Varankovich *et al.*, 2015). Contudo, não existem evidências de algum benefício no uso de probióticos após o início da terapia antibiótica (Mizock, 2015).

Diarreia infecciosa na infância

As doenças diarreicas são os problemas de saúde mais comuns nos países em desenvolvimento e a primeira causa de hospitalização em crianças. O rotavírus é o vírus mais comum associado à diarreia aguda em crianças com idade compreendida entre um mês e três anos (Sharif *et al.*, 2016).

Os resultados de um estudo duplo-cego, controlado por placebo, envolvendo 287 crianças de 1 a 36 meses, mostrou que os probióticos são mais eficazes do que um placebo no tratamento da diarreia aguda (Islam, 2016). Um outro estudo, dirigido por Cochrane, em 2010, analisou 63 ensaios que envolveram bebês e crianças. Segundo o autor, em todos os estudos, a duração mais curta da diarreia e a menor frequência de fezes sugere que a utilização de probióticos tem efeitos benéficos no tratamento da diarreia aguda (Mizock, 2015; Sharif *et al.*, 2016). No entanto, estudos adicionais serão necessários para estabelecer diretrizes claras para a seleção de produtos, dosagem e duração do tratamento com probióticos no caso da diarreia aguda na infância (Daliri e Lee, 2015; Vandenplas *et al.*, 2015).

Doença inflamatória intestinal

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é um distúrbio multifatorial crônico caracterizado por inflamação do TGI e que causa diarreia aquosa acompanhada de dor abdominal (Pandey *et al.*, 2015). A DII compreende a colite ulcerosa (CU) e a doença de Crohn (DC). Patologicamente, a DC é caracterizada por lesões inflamatórias e ulcerações que podem estar presentes em qualquer parte do trato gastrointestinal, enquanto a CU é mais superficial, afetando o revestimento do intestino grosso e reto (Islam, 2016; Mizock, 2015; Vandenplas *et al.*, 2015).

Na CU, o uso de várias espécies probióticas como *S. boulardii*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium bifidum* mostrou resultados promissores nesta doença. Os efeitos terapêuticos do consumo de probióticos na DC são provenientes da ação competitiva comensal, da flora patogénica e da influência na resposta imune. Os probióticos também impedem a DII, restaurando a integridade da mucosa protetora intestinal (Pandey *et al.*, 2015).

Outras aplicações

A tabela 2 resume uma série de indicações clínicas para as quais a administração oral de probióticos, prebióticos ou simbióticos apresenta benefícios para a saúde.

Alterações da microbioma intestinal nos estágios iniciais da vida podem estar inter-relacionadas com a suscetibilidade futura a várias doenças, tais como a doença inflamatória intestinal, obesidade, cancro do cólon e algumas alergias a alterações da microbioma intestinal (Daliri e Lee, 2015). Nessa medida, a continuidade da investigação será crucial para o esclarecimento dessas inter-relações e compreensão das potencialidades e limitações decorrentes da utilização de probióticos.

Tabela 2- Uso clínico de probióticos, prebióticos e simbióticos

Adaptado de: (Amara e Shibl, 2015; Patel e DuPont, 2015)

Probiótico/Prebiótico/Simbiótico	Efeito terapêutico
<i>Escherichia coli</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Eczema
<i>Lactobacillus rhamnosus GR-1</i> <i>Lactobacillus reuteri RC-14</i>	Infeções do trato urinário
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Intolerância à lactose
<i>Lactobacillus rhamnosus GR-1</i> <i>Lactobacillus reuteri RC-14</i>	Candidíase Vaginal
<i>Enterococcus faecium M-74 lactic acid</i> <i>bactéria</i>	Prevenção do cancro do colon
<i>Enterococcus faecium M-74</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i> <i>Lactobacillus plantarum PH04</i>	Hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares
<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Prevenção da Atopia
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Prevenção do eczema atópico
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Úlcera péptica
<i>Lactobacillus casei</i>	Gastroenterite
<i>Lactobacillus plantarum species 299</i> (LP299)	Hiperpermeabilidade intestinal
<i>Bifidobacterium</i> e frutooligossacarídeos	Tratamento da encefalopatia hepática
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> e frutooligossacarídeos	Aumentar o colesterol HDL e reduzir a glicemia em jejum
Xilooligossacarídeos e inulina	Controle lipídico, efeitos cardiovasculares, prevenção do cancro

3.4. Novos Desafios

Paralelamente à investigação que tem sido realizada com vista à compreensão da relação entre a microbiota e a saúde intestinal, a resposta imunológica e a saúde da pele, durante os últimos dez anos, um número crescente de estudos têm sido realizados com o objetivo de melhorar a compreensão sobre os mecanismos de ação dos probióticos e dos prebióticos. Esses estudos têm demonstrado que a microbiota intestinal pode regular a inflamação, a adiposidade, a saciedade, o gasto de energia e o metabolismo da glicose. À medida que os conhecimentos sobre os mecanismos de ação *in vivo* tem sido aprofundados, a importância da sua translação para humanos é evidenciada dado o seu expectável contributo para a melhoria global da saúde dos indivíduos (Mishra *et al.*, 2015; Pham *et al.*, 2017).

3.4.1. Engenharia do Microbioma Humano

As características de cada ecossistema é resultado da complexa rede de interações dentro das comunidades microbianas e entre os microrganismos e o hospedeiro, bem como das diversas respostas aos metabolitos produzidos pelas comunidades microbianas. Assim, a perturbação dos microbiomas pode causar uma gama muito variada e extensa de alterações no hospedeiro e no ambiente, nomeadamente a redução de aptidões do hospedeiro e da fertilidade do solo (Foo *et al.*, 2017; Karamanou *et al.*, 2017). A engenharia de microbiomas pode atuar ao nível da composição do microbioma para melhorar o fenótipo do hospedeiro e beneficiar os ecossistemas, conferindo vários benefícios à saúde pública (Figura 8). As suas aplicações podem ser observadas em diversas áreas científicas, tais como a Nanotecnologia, a Química e a Biologia. Instrumentos em nanoescala estão a ser produzidos para interagir com o microbioma humano de forma a monitorizar, em tempo real, o estado de saúde ou a proteção do local contra o início precoce do estado de desequilíbrio ou atuar na correção (Foo *et al.*, 2017; Pham *et al.*, 2017).

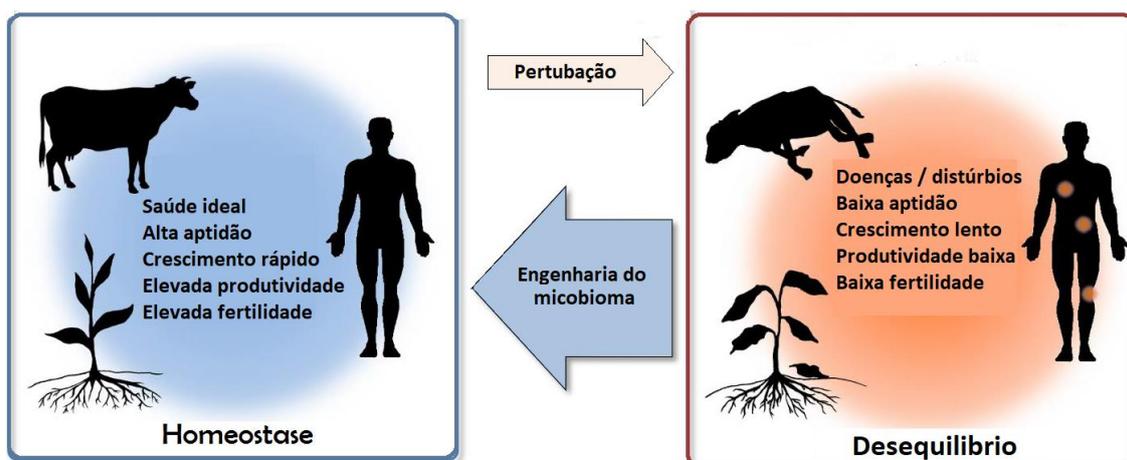


Figura 8- Visão geral da aplicação e progresso da engenharia de microbiomas

Adaptada de : (Foo *et al.*, 2017)

A intervenção mais óbvia para a engenharia do microbioma intestinal é a modificação da dieta, através da suplementação por compostos químicos que alimentem grupos bacterianos específicos, tais como os prebióticos referidos anteriormente (Brussow, 2016). Prebióticos como galactooligosacarídeos e fibras de milho solúveis têm sido utilizados para a fermentação seletiva pela microbiota intestinal humana, aumentando notavelmente *Bifidobacterium* e diminuindo *C. histolyticum*, com um benefício global positivo para a saúde humana (Foo *et al.*, 2017).

O transplante da microbiota fecal (TMF) tem sido utilizado para restabelecer a composição microbiana saudável em doentes com doenças gastrointestinais. Este método envolve a aquisição de material fecal de doadores saudáveis e a administração das respectivas suspensões de microbiota no TGI dos doentes. O objetivo desta intervenção é restaurar um microbioma normal em indivíduos com doenças associadas à disbiose. Atualmente, a única indicação para a TMF é a recorrência múltipla de infecções por *Clostridium difficile*. Aproximadamente 85% dos doentes afetados podem ser tratados com sucesso pela FMT, em comparação com apenas 30% tratados convencionalmente com terapia antimicrobiana prolongada (Foo *et al.*, 2017; Gupta e Khanna, 2017; Wang *et al.*, 2019). O TMF também tem sido utilizado no tratamento de outras doenças, tais como artrite reumatóide, autismo e esclerose múltipla. No entanto, a

compreensão sobre os efeitos da TMF nestas doenças requer estudos adicionais (Wang *et al.*, 2019).

Para a modulação do microbioma infantil estão em desenvolvimento estudos e ensaios clínicos específicos. No caso do microbioma intestinal do adulto, a sua complexidade juntamente com a elevada variabilidade interindividual têm dificultado o progresso da engenharia de biomas. Neste caso, a sua aplicação poderá exigir a utilização de microbiotas humanas menos complexas e mais acessíveis (narinas, nasofaringe, vagina, pele), bem como ferramentas mais refinadas, designadamente RNAs reguladores, alimentação metabólica cruzada e produção de probióticos recombinantes (Brussow, 2016).

3.4.2. Probióticos Recombinantes

Com o aparecimento de agentes patogénicos multirresistentes e o esgotamento de opções no domínio dos antibióticos, tornou-se urgente a identificação de métodos alternativos para combater esses microrganismos patogénicos e frequentemente mortais. Um desses métodos é o uso de probióticos recombinantes ou sintéticos que têm várias vantagens face aos probióticos tradicionais (Chua *et al.*, 2017). Deste modo, os probióticos recombinantes deverão permitir superar as limitações dos probióticos atuais. Esse processo envolve a introdução de novos fatores genéticos em linhagens bacterianas com vista à melhoria da sua eficácia. Os probióticos recombinantes, geralmente utilizados como suplementos dietéticos ou aplicados topicamente, permitem proteger o hospedeiro de infeções, stress oxidativo, doenças inflamatórias e respostas autoimunes (Carvalho *et al.*, 2017). Alguns dos benefícios dos probióticos recombinantes estão exemplificados na Figura 9.

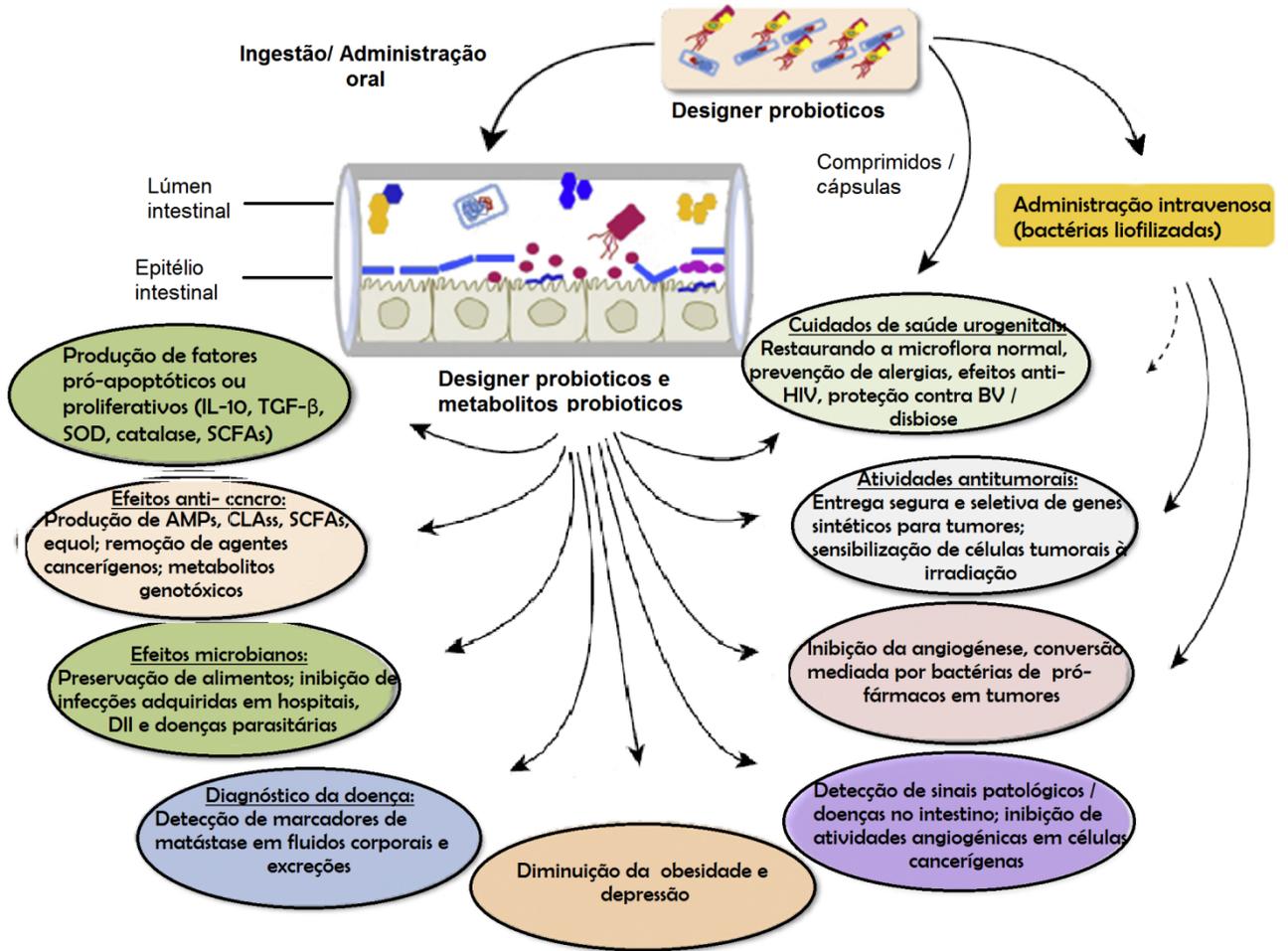


Figura 9- Benefícios para a saúde dos probióticos recombinantes

Adaptado de: (Singh *et al.*, 2017)

A capacidade de certas bactérias colonizarem tumores sólidos abre caminhos para o desenvolvimento de novas tecnologias, tanto no diagnóstico como na terapêutica. Na última década, a biologia sintética interveio no desenvolvimento de microrganismos que visam especificamente células tumorais. Os microbiologistas ao longo dos anos relataram uma variedade de anaeróbios que proliferam preferencialmente em tumores sólidos, incentivando assim o uso desses microrganismos como portadores de agentes anticancerígenos. Entre os vários anaeróbios testados, as linhagens dos géneros *Escherichia*, *Bifidobacterium*, *Salmonella* e *Clostridium* são as mais projectadas (Sleator, 2015).

A *E. coli* Nissle 1917 programável, quando administrado por via oral, pode detectar sinais de metástase hepática na urina dos doentes, sendo considerada um probiótico de diagnóstico *in vivo* (Singh *et al.*, 2017).

A estirpe *Bifidobacterium longum* demonstrou uma excelente capacidade de colonização em tumores sólidos, sendo capaz de provocar uma forte resposta imune no hospedeiro. Num estudo realizado em 2016, por Wei., um dos objetivos foi desenvolver um novo sistema de administração da tumstatina, uma angiostatina poderosa que inibe a proliferação e induz a apoptose de células endoteliais vasculares tumorais, usando a *Bifidobacterium longum* modificada. Wei e seus colaboradores, relataram uma significativa redução da metástase tumoral, bem como o aumento da sobrevida em camundongos tratados com *Bifidobacterium longum* modificada, comparativamente a um grupo controle (Chua *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2016).

A engenharia de microrganismos para fins terapêuticos tornou-se cada vez mais sofisticada ao longo dos anos, com circuitos específicos que controlam com precisão a expressão e libertação de moléculas terapêuticas. Deste modo, abriu-se uma vasta gama de possibilidades terapêuticas associadas aos probióticos recombinantes (Singh *et al.*, 2017). Algumas das suas indicações terapêuticas estão descritas na Tabela 3.

Algumas doenças crónicas, tais como a doença de Alzheimer, Autismo, Défice de Atenção, Osteoartrite e acidente vascular cerebral estão a aumentar rapidamente entre a população humana. A manipulação do ecossistema intestinal por probióticos recombinantes ou pelo transplante de microbiota fecal poderá ser uma alternativa contra estas doenças (Chua *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017).

Tabela 3- Probióticos recombinantes na prevenção e tratamento de doenças em seres humanos

Adaptado de: (Chua *et al.*, 2017)

Patologia	Probiótico Recombinante	Mecanismo
Diabetes tipo I	<i>L. gasseri</i>	Reprogramação de células epiteliais intestinais em células B secretoras de insulina por GLP-1 (1–37), expressando <i>L. gasseri</i>
Hipertensão	<i>L. plantarum</i> NC8	Expressão de sequências de codificação ACEIP de TFP e YFP unidas por um ligante de arginina
Obesidade	<i>EcN</i>	Expressão de acilfosfatidiletanolaminas
Infeção por Salmonella e Cólera	<i>Salmonella</i>	Expressão do antígeno heterólogo da subunidade B do antígeno da toxina Vibrio cholera
Infeção por H. pylori	<i>B. subtilis</i>	Exibição da proteína urease B de <i>H. pylori</i> no revestimento de esporos de <i>B. subtilis</i>
Infeção por HIV	<i>L. lactis</i>	Expressão de <i>Streptococcus pyogenes</i> T3 pilus fundida a uma mordaca de antígeno HIV P24 na superfície de <i>L. lactis</i> (LL-Gag)
Doenças inflamatórias intestinais	<i>L. lactis</i>	Entrega da proteína IL-10 usando o sistema de expressão controlada induzível

IV. Conclusão

A microbiota refere-se a toda a população de microrganismos que coloniza um local específico, e inclui bactérias, fungos, arqueias, vírus e protozoários (Jandhyala *et al.*, 2015). Desde o nascimento, o corpo humano é habitado por um enorme quantidade e diversidade de microrganismos. O microbioma humano atua em estreita concertação com as mucosas e é capaz de induzir efeitos imunológicos, inflamatórios e regulatórios, localmente e/ou em locais distantes. A obtenção de energia a partir dos nutrientes, o desenvolvimento do sistema imunitário, a biossíntese e metabolismo proteico e a resistência à colonização por agentes patogênicos são processos desempenhados pela microbiota e insubstituíveis pelo metabolismo humano (Barroso, 2014). Contudo, torna-se necessário melhorar a percepção acerca da relação entre a composição da microbiota e as funções desempenhadas uma vez que a maioria dos estudos decorreram em curtos intervalos de tempo, são heterogêneos quanto ao tipo de amostras utilizadas e o número de amostras estudado é reduzido (Brodmann *et al.*, 2017).

Sabe-se que após o nascimento, o tipo de alimentação molda diretamente a microbiota, influenciando tanto a diversidade quanto a riqueza (Billimoria *et al.*, 2016). Em recém-nascidos prematuros, várias misturas de oligossacarídeos e leites de fórmula contendo prebióticos foram extensivamente estudados. Essas misturas prebióticas alteram o microbioma fecal, diminuem o pH fecal, melhoram a motilidade gástrica e diminuem a intolerância à alimentação. No entanto, uma metanálise de sete ensaios clínicos randomizados controlados por placebo de prebióticos não mostrou diminuição na enterocolite necrosante, sepse ou morte. Adicionalmente, a análise comparativa entre lactentes tratados com misturas prebióticas e lactentes tratados com placebo não registou alterações significativas, nomeadamente ao nível da permeabilidade intestinal (Hutkins *et al.*, 2016).

A eficácia do uso dos probióticos foi investigada no tratamento e prevenção de diversas patologias, tal como mencionado na Tabela 2. O uso de probióticos em crianças e adultos está aprovado no caso do tratamento da DAA e na Diarreia infecciosa na infância. Contudo, a eficácia dos probióticos na prevenção da diarreia do viajante é limitada e inconsistente, não sendo por isso recomendado o seu uso nesta patologia (Mizock, 2015).

Recentemente, os probióticos foram associados a diversas patologias extraintestinais, designadamente a dermatite atópica. Vários ensaios clínicos demonstraram que os probióticos ou prebióticos são agentes promissores no tratamento da dermatite atópica, demonstrando melhorias significativas na gravidade da patologia. No entanto, o seu uso não é muito recorrente uma vez que alguns estudos demonstraram que o uso isolado de prebióticos não tem qualquer efeito benéfico nos sintomas da patologia (Chang *et al.*, 2016).

Estudos recentes sugerem que estirpes probióticas possam ter um efeito citotóxico, inibindo a proliferação de vários tipos de células cancerígenas. Os probióticos mostraram efeitos inibitórios contra o desenvolvimento do cancro em modelos animais de carcinogénese, especialmente no cancro do cólon (Shokryazdan *et al.*, 2017). No entanto, não existe, ainda, uma evidência clara quanto á eficácia dos probióticos no caso de cancros humanos, nomeadamente no cancro do cólon. A maioria dos dados publicados em estudos com seres humanos apenas discutem se os probióticos podem ajudar a melhorar a tolerância à quimioterapia, especialmente no controlo da frequência da diarreia grave (Drago, 2019).

Na bibliografia é consensual a ideia de que os probióticos, prebióticos e simbióticos têm a capacidade de reparar alterações da microbiota associadas a diversos estados patológicos, tendo sido revelada a sua eficácia na prevenção e tratamento de inúmeras patologias em diversos estudos clínicos (Capurso, 2016). No entanto, uma condição importante para a aprovação de novos probióticos é um número suficiente de ensaios clínicos em humanos. De um modo geral, a maioria dos probióticos, simbióticos e prebióticos carece de estudos clínicos em seres humanos, sendo necessários ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos, controlados por placebo, estudos de dose-resposta e estudos toxicológicos para estabelecer o número apropriado de bactérias a serem administradas e a matriz correta para fornecerem propriedades probióticas (Brodmann *et al.*, 2017).

Face ao crescente interesse em estudar os probióticos para o tratamento e prevenção de determinadas patologias, a ciência desenvolveu novos métodos para desenhar probióticos específicos para cada doença. Consequentemente, a engenharia de microbiomas tem sido utilizada, com sucesso, para alterar a microbiota, representando

uma perspectiva terapêutica promissora para a melhoria global da saúde humana (Foo *et al.*, 2017).

4.1. Perspetivas futuras

Os probióticos representam uma abordagem promissora para a melhoria da saúde humana uma vez que poderão auxiliar a prevenção e o tratamento de diversas doenças de interesse clínico. No entanto, futuramente, é essencial entender de forma mais clara quais as características que um microrganismo deve possuir para ser utilizado na formulação de produtos probióticos. Para além disso, uma legislação clara que regule a produção de probióticos, bem como um rigoroso controlo de segurança de todas as suas fases de produção será crucial para garantir os desejados efeitos benéficos dos probióticos em seres humanos.

Num futuro não muito distante, é expectável que cada ser humano possa colonizar o intestino com bactérias geneticamente modificadas que detetam e eliminam doenças precocemente. Na sequência dos avanços registados no domínio da biologia sintética, a engenharia de microbiomas representa uma área muito promissora para a criação de organismos biológicos que executem as tarefas desejadas. Neste sentido, será importante o desenvolvimento de mecanismos de segurança adequados para garantir o controlo desses organismos, assim como novas ferramentas e tecnologias que permitam fornecer informações mais detalhadas e precisas sobre o microbioma. Os avanços futuros deverão, por isso, ajudar a esclarecer as interações entre a microbiota e a fisiologia humana, e os seus possíveis papéis no desenvolvimento de doenças de etiologia muito diversa, tais como doenças do fígado, infeções microbianas, cancro (nomeadamente o cancro do cólon), doenças imunológicas, doenças psiquiátricas e doenças metabólicas.

V. Referências Bibliográficas

- Ahire, J. J., Mokashe, N. U., Patil, H. J., *et al.* (2013). Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *J Food Sci Technol*, 50, pp. 26-34.
- Amara, A. A. Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm J*, 23, pp. 107-14.
- Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., & Taveira, N. (2014). *Microbiologia Médica 1*, Lisboa: Lidel.
- Billimoria, Z. C., Pandya, S., Bhatt, P., *et al.* (2016). Probiotics-To Use, or Not to Use? An Updated Meta-analysis. *Clin Pediatr (Phila)*, 55, pp. 1242-1244.
- Blottiere, H. M., de Vos, W. M., Ehrlich, S. D., *et al.* (2013). Human intestinal metagenomics: state of the art and future. *Curr Opin Microbiol*, 16, pp. 232-9.
- Borre, Y. E., O'Keeffe, G. W., Clarke, G., *et al.* (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med*, 20, pp. 509-18.
- Brodmann, T., Endo, A., Gueimonde, M., *et al.* (2017). Safety of Novel Microbes for Human Consumption: Practical Examples of Assessment in the European Union. *Front Microbiol*, 8, pp. 1725.
- Brussow, H. (2016). Biome engineering-2020. *Microb Biotechnol*, 9, pp. 553-63.
- Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect*, 44, pp. 1-8.
- Butler, M. I., Cryan, J. F. Dinan, T. G. (2019). Man and the Microbiome: A New Theory of Everything? *Annu Rev Clin Psychol*, 15, pp. 371-398.
- Capurso, L. (2016). [Probiotics]. *Recenti Prog Med*, 107, pp. 267-77.

Carvalho, R. D., Breyner, N., Menezes-Garcia, Z., *et al.* (2017). Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. *Microb Cell Fact*, 16, pp. 27.

Chang, Y. S., Trivedi, M. K., Jha, A., *et al.* (2016). Synbiotics for Prevention and Treatment of Atopic Dermatitis: A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Pediatr*, 170, pp. 236-42.

Chernikova, D., Yuan, I. Shaker, M. (2019). Prevention of allergy with diverse and healthy microbiota: an update. *Curr Opin Pediatr*, 31, pp. 418-425.

Chua, K. J., Kwok, W. C., Aggarwal, N., *et al.* (2017). Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases. *Curr Opin Chem Biol*, 40, pp. 8-16.

Coburn, B. Guttman, D. S. (2015). The human microbiome. *CMAJ*, 187, pp. 825.

Cremon, C., Barbaro, M. R., Ventura, M., *et al.* (2018). Pre- and probiotic overview. *Curr Opin Pharmacol*, 43, pp. 87-92.

Cuevas-Sierra, A., Ramos-Lopez, O., Riezu-Boj, J. I., *et al.* (2019). Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Adv Nutr*, 10, pp. 17-30.

Daliri, E. B.-M. Lee, B. H. (2015). New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness*, 4, pp. 56-65.

Davenport, E. R., Sanders, J. G., Song, S. J., *et al.* (2017). The human microbiome in evolution. *BMC Biol*, 15, pp. 127.

de Almada, C. N., Nunes de Almada, C., Martinez, R. C., *et al.* (2015). Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, pp. 4175-99.

do Carmo, M. S., Santos, C. I. D., Araujo, M. C., *et al.* (2018). Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. *Food Funct*, 9, pp. 5074-5095.

Doron, S. Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis*, 60 Suppl 2, pp. 129-34.

Dou, J. Bennett, M. R. (2017). Synthetic Biology and the Gut Microbiome. *Biotechnol J*, 5, pp. 1-41.

Drago, L. (2019). Probiotics and Colon Cancer. *Microorganisms*, 7, pp. 66.

Foo, J. L., Ling, H., Lee, Y. S., *et al.* (2017). Microbiome engineering: Current applications and its future. *Biotechnol J*, 12, pp. 1-9.

Gadecka, A. Bielak-Zmijewska, A. (2019). Slowing Down Ageing: The Role of Nutrients and Microbiota in Modulation of the Epigenome. *Nutrients*, 11, pp. 1251.

Gerasimidis, K., Bertz, M., Hanske, L., *et al.* (2014). Decline in presumptively protective gut bacterial species and metabolites are paradoxically associated with disease improvement in pediatric Crohn's disease during enteral nutrition. *Inflamm Bowel Dis*, 20, pp. 861-71.

Giorgetti, G., Brandimarte, G., Fabiocchi, F., *et al.* (2015). Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. *J Immunol Res*, 2015, pp. 501361.

Gomez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Martinez-Costa, C., *et al.* (2019). The Microbiota and Malnutrition: Impact of Nutritional Status During Early Life. *Annu Rev Nutr*, 39, pp. 267-290.

Gupta, A. Khanna, S. (2017). Fecal Microbiota Transplantation. *JAMA*, 318, pp. 102.

Hutkins, R. W., Krumbeck, J. A., Bindels, L. B., *et al.* (2016). Prebiotics: why definitions matter. *Curr Opin Biotechnol*, 37, pp. 1-7.

Indrio, F., Martini, S., Francavilla, R., *et al.* (2017). Epigenetic Matters: The Link between Early Nutrition, Microbiome, and Long-term Health Development. *Front Pediatr*, 5, pp. 178.

Islam, S. U. (2016). Clinical Uses of Probiotics. *Medicine (Baltimore)*, 95, pp. 2658.

Issa, I. Moucari, R. (2014). Probiotics for antibiotic-associated diarrhea: do we have a verdict? *World J Gastroenterol*, 20, pp. 17788-95.

Jagodzinski, A., Zielinska, E., Laczanski, L., *et al.* (2019). The early years of life. Are they influenced by our microbiome? *Ginekol Pol*, 90, pp. 228-232.

Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., *et al.* (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*, 21, pp. 8787-803.

Karamanou, M., Papaioannou, T. G., Soulis, D., *et al.* (2017). Engineering 'Posthumans': To Be or Not to Be? *Trends Biotechnol*, 35, pp. 677-679.

Kim, D., Yoo, S. A. Kim, W. U. (2016). Gut microbiota in autoimmunity: potential for clinical applications. *Arch Pharm Res*, 39, pp. 1565-1576.

Krautkramer, K. A., Kreznar, J. H., Romano, K. A., *et al.* (2016). Diet-Microbiota Interactions Mediate Global Epigenetic Programming in Multiple Host Tissues. *Mol Cell*, 64, pp. 982-992.

Kumar, H., Salminen, S., Verhagen, H., *et al.* (2015). Novel probiotics and prebiotics: road to the market. *Curr Opin Biotechnol*, 32, pp. 99-103.

La Fata, G., Weber, P. Mohajeri, M. H. (2017). Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 11, pp. 11-21.

Langdon, A., Crook, N. Dantas, G. (2016). The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med*, 8, pp. 39.

Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., *et al.* (2016). Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig Dis*, 34, pp. 260-8.

Lepage, P., Leclerc, M. C., Joossens, M., *et al.* (2013). A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*, 62, pp. 146-58.

Leso, V., Vetrani, I., Della Volpe, I., *et al.* (2019). Welding Fume Exposure and Epigenetic Alterations: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*, 16, pp. 1745.

Li, D., Wang, P., Wang, P., *et al.* (2016). The gut microbiota: A treasure for human health. *Biotechnol Adv*, 34, pp. 1210-1224.

Linares, D. M., Ross, P. Stanton, C. (2016). Beneficial Microbes: The pharmacy in the gut. *Bioengineered*, 7, pp. 11-20.

Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., *et al.* (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65, pp. 330-9.

Markowiak, P. Slizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9, pp. 1021.

McCarville, J. L., Caminero, A. Verdu, E. F. (2016). Novel perspectives on therapeutic modulation of the gut microbiota. *Therap Adv Gastroenterol*, 9, pp. 580-93.

Mishra, V., Shah, C., Mokalsh, N., *et al.* (2015). Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *J Agric Food Chem*, 63, pp. 3615-26.

Mizock, B. A. (2015). Probiotics. *Dis Mon*, 61, pp. 259-90.

Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., *et al.* (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging*, 4, pp. 267-285.

Nami, Y., Haghshenas, B., Abdullah, N., *et al.* (2015). Probiotics or antibiotics: future challenges in medicine. *J Med Microbiol*, 64, pp. 137-46.

Pandey, K. R., Naik, S. R. Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol*, 52, pp. 7577-87.

Patel, R. DuPont, H. L. (2015). New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin Infect Dis*, 60 Suppl 2, pp. 108-21.

Pham, H. L., Ho, C. L., Wong, A., *et al.* (2017). Applying the design-build-test paradigm in microbiome engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 48, pp. 85-93.

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., *et al.* (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr*, 10, pp. 49-S66.

Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 30, pp. 17-25.

Sanchez, B., Delgado, S., Blanco-Miguez, A., *et al.* (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res*, 61. pp. 1-15.

Sharif, M. R., Kashani, H. H., Ardakani, A. T., *et al.* (2016). The Effect of a Yeast Probiotic on Acute Diarrhea in Children. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 8, pp. 211-214.

Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., *et al.* (2017). Probiotics: From Isolation to Application. *J Am Coll Nutr*, 36, pp. 666-676.

Singh, B., Mal, G. Marotta, F. (2017). Designer Probiotics: Paving the Way to Living Therapeutics. *Trends Biotechnol*, 35, pp. 679-682.

Sleator, R. D. (2015). Designer probiotics: Development and applications in gastrointestinal health. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 6, pp. 73-8.

Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., *et al.* (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 529, pp. 212-5.

Syngai, G. G., Gopi, R., Bharali, R., *et al.* (2016). Probiotics - the versatile functional food ingredients. *J Food Sci Technol*, 53, pp. 921-33.

Valcheva, R. Dieleman, L. A. (2016). Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 30, pp. 27-37.

van der Meulen, T. A., Harmsen, H., Bootsma, H., *et al.* (2016). The microbiome-systemic diseases connection. *Oral Dis*, 22, pp. 719-734.

Vandenplas, Y., Huys, G. Daube, G. (2015). Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria*, 91, pp. 6-21.

Varankovich, N. V., Nickerson, M. T. Korber, D. R. (2015). Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. *Front Microbiol*, 6, pp. 685.

Wang, B., Yao, M., Lv, L., *et al.* (2017a). The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*, 3, pp. 71-82.

Wang, J. W., Kuo, C. H., Kuo, F. C., *et al.* (2019). Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J Formos Med Assoc*, 118 Suppl 1, pp. 23-31.

Wang, Y., Wang, B., Wu, J., *et al.* (2017b). Modulation of Gut Microbiota in Pathological States. *Engineering*, 3, pp. 83-89.

Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., *et al.* (2017c). Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients*, 9, pp. 521.

Wei, C., Xun, A. Y., Wei, X. X., *et al.* (2016). Bifidobacteria Expressing Tumstatin Protein for Antitumor Therapy in Tumor-Bearing Mice. *Technol Cancer Res Treat*, 15, pp. 498-508.