

Patrícia Coutinho Laranjeira

Probióticos – Revisão Bibliográfica e Perspetivas Futuras

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2020

Patrícia Coutinho Laranjeira

Probióticos – Revisão Bibliográfica e Perspetivas Futuras

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2020

Probióticos e Perspetivas Futuras

Patrícia Coutinho Laranjeira

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora Amélia Maria Marques da Silva Rodrigues Sarmiento Assunção.

Sumário

O microbiota intestinal, conjunto de comunidades microbianas que colonizam o trato gastrointestinal, mantém uma relação de simbiose com o hospedeiro e está envolvido em processos essenciais para a manutenção da sua saúde. Alterações na composição e função deste complexo sistema resultam no desenvolvimento de patologias. Assim, a modulação do microbiota pode ser importante para a prevenção da doença e mesmo ser utilizada como adjuvante em terapêutica.

A evolução tecnológica permitiu investigar com mais detalhe a composição do microbiota e a sua relação com o hospedeiro, permitindo desenvolver novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças multifatoriais e emergentes. De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), os probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Os efeitos benéficos dos probióticos são diversos. Através da modulação do microbiota, modulam a resposta imunitária, são responsáveis pelo reforço da barreira epitelial intestinal e têm influência noutros órgãos do organismo. A sua administração tem uma vasta utilização no tratamento e prevenção de patologias gastrointestinais, podendo também ser utilizada no contexto de patologias em diferentes sistemas.

Esta dissertação tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica do conhecimento científico atual sobre o papel dos probióticos na saúde humana, relacionando-o com a composição do microbiota e abordando os mecanismos pelos quais exercem efeitos benéficos em patologias diversas.

Palavras-chave: Probióticos, microbiota, probióticos de próxima geração

Abstract

The intestinal microbiota, a group of microbial communities that colonize the gastrointestinal tract, maintains a symbiotic relationship with the host and is involved in essential processes for maintaining health. Changes in the composition and function of this complex system result in the development of diseases. So, microbiota modulation may be important for disease prevention and also be used as a therapeutic adjuvant.

Technical advances allowed to investigate in more detail the composition of the microbiota and its relationship with the host, resulting in the development of new therapeutic approaches for the treatment of multifactorial and emerging diseases.

Probiotics, according to the Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO), are “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer benefits to the host”.

The beneficial effects of probiotics are diverse. Through modulation of the microbiota, probiotics modulate the immune response, are responsible for strengthening the intestinal epithelial barrier and also impact the function of diverse organs of the body. Its administration has a wide use in the treatment and prevention of gastrointestinal pathologies and may also be used for the treatment pathologies that affect other systems.

The aim of this dissertation is to carry out a bibliographic review of the current scientific knowledge on the role of probiotics in human health, relating it to the microbiota composition and also approach the mechanisms by which they exert beneficial effects in different pathologies.

Key words: Probiotics, microbiota, next generation probiotics

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Amélia Assunção pela atenção, apoio e disponibilidade demonstrada durante a realização da tese.

Agradeço à minha mãe, ao meu irmão e à Sílvia por todo o apoio nestes três anos de sacrifício. Ao Luís que nunca me deixou desistir, obrigada.

Às minhas entidades patronais agradeço a compreensão e a flexibilidade de horários.

Aos meus colegas e amigos que embarcaram nesta aventura agradeço a coragem, o incentivo e a boa disposição sempre. Convosco foi mais fácil.

Índice

Sumário.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos.....	iii
I. Introdução.....	1
II. Microbiota Humano.....	3
1. Composição e variabilidade entre populações.....	3
2. Funções e Benefícios do microbiota.....	7
3. Distúrbios do Microbiota – Disbiose.....	10
III. Probióticos e Promoção da saúde.....	14
1. Perspetiva histórica.....	14
2. Propriedades.....	16
3. Microrganismos relevantes usados como probióticos.....	18
4. Mecanismos de ação.....	21
4.1. Modulação do sistema imunitário.....	21
4.2. Interação com o microbiota intestinal.....	22
4.3. Reforço da barreira epitelial intestinal.....	23
4.4. Efeitos em diferentes órgãos através da regulação do sistema imunológico e da produção de neurotransmissores.....	24
5. Aplicações clínicas.....	25

5.1. Patologias intestinais	25
5.2. Patologias Extraintestinais.....	30
IV. Perspetivas Futuras	36
V. Conclusão	38
VI. Referências	40

Índice de Figuras

Figura 1 - Composição do microbiota intestinal.	5
Figura 2 - Caracterização de disbiose.....	12
Figura 3 - Seleção de probióticos	17
Figura 4 - Biotecnologia e outras tecnologias no desenvolvimento de probióticos	20

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Exemplos de disbiose associada a patologia	11
Tabela 2 - Principais microrganismos utilizados como probióticos.....	18
Tabela 3 - Efeitos de probióticos na obesidade	31

Abreviaturas

AMP - Péptidos antimicrobianos (“anti-microbial peptides”)

BAL - Bactérias ácido lácticas

CDAD - Diarreia associada a *Clostridium difficile* (“*Clostridium difficile*-associated diarrhea”)

CRC - Cancro colorretal (“colo-rectal cancer”)

CU- Colite ulcerosa

DAA - Diarreia associada a antibióticos

DC- Doença de Crohn

DII - Doença inflamatória intestinal

DNA - Ácido desoxirribonucleico

GABA - Ácido gama-aminobutírico (“gamma-aminobutyric acid”)

GALT - Tecido linfático associada ao intestino (“gut-associated lymphoid tissue”)

IgA - Imunoglobulina A

IgG- Imunoglobulina G

NK – “Natural Killer”

NLR- Recetores tipo NOD (“NOD-like receptors”)

NPGs - Probióticos da próxima geração (“next-generation probiotics”)

PAMPs – Padrões moleculares associados a patogénios (“pathogen -associated molecular patterns”)

PRR- Recetores de reconhecimento de padrões (“pattern-recognition receptors”)

SCFA - Ácidos gordos de cadeia curta (“short-chain fatty acids”)

SCI - Síndrome do cólon irritável

SIgA - Imunoglobulina A secretada

TGI - Trato gastrointestinal TLR - Recetores tipo Toll (“Toll-like receptors”)

Treg - Linfócitos T reguladores

UFC- Unidades formadoras de colónias

I. Introdução

O microbiota humano, do qual fazem parte 100 triliões de microrganismos, estabelece com o hospedeiro uma relação de simbiose e desempenha um papel importante na promoção da saúde e no aparecimento e desenvolvimento de doenças. Ao microbiota intestinal é atribuída a participação em processos biológicos que incluem modulação do fenótipo metabólico, regulação do desenvolvimento epitelial e influência na imunidade inata. O envolvimento nestes processos vitais fazem com que o microbiota intestinal seja considerado um órgão de extrema importância (Wang, Yao et al. 2017).

O aumento da incidência de doenças multifatoriais como diabetes mellitus, obesidade, asma, doenças neurodegenerativas e doença inflamatória intestinal têm sido associado a quadros de disbiose intestinal. Esta condição caracteriza-se por uma anormal composição do microbiota e alterações na sua função como resultado de vários fatores ambientais e relacionados com o hospedeiro (Levy, Kolodziejczyk et al. 2017).

O conhecimento aprofundado do microbiota intestinal tem conduzido ao desenvolvimento de ferramentas como probióticos, com o objetivo de corrigir essas alterações e promover a saúde (Adak and Khan 2019).

Os probióticos, segundo a Food and Agriculture Organization (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Os seus efeitos benéficos relacionam-se com os seus mecanismos gerais de ação. De um modo geral, os probióticos modulam a resposta imunitária, interagem com o microbiota intestinal, reforçam a barreira epitelial intestinal e influenciam outros órgãos do organismo através do sistema imunitário e da produção de neurotransmissores (Sánchez, Delgado et al. 2017, Sanders, Merenstein et al. 2019).

A maior evidência dos efeitos benéficos dos probióticos é em patologias do trato gastrointestinal, por exemplo diarreia associada a antibióticos, síndrome do cólon irritável e doença inflamatória intestinal (Sánchez, Delgado et al. 2017).

Contudo, a aplicação dos probióticos em patologias pouco exploradas como obesidade e doenças metabólicas, doenças alérgicas e doenças neurológicas tem revelado resultados promissores (Sharma and Im 2018, Cerdó, García-Santos et al. 2019, Misra and Mohanty 2019).

A evolução tecnológica levou ao reconhecimento de novas estirpes microbianas com potencial benéfico designadas por probióticos da próxima geração (NPGs). O estudo aprofundado desta nova classe de probióticos permitirá o desenvolvimento de ferramentas clínicas mais específicas para auxiliar no tratamento de doenças emergentes (O'Toole, Marchesi et al. 2017).

O objetivo desta dissertação é realizar uma revisão bibliográfica da literatura científica atual sobre o papel dos probióticos na saúde humana abordando a relação do microbiota com o hospedeiro, o impacto da disbiose na saúde e os mecanismos através dos quais os probióticos exercem o seus efeitos benéficos em patologias diversas.

Métodos

Para a realização desta dissertação foi realizada a pesquisa recorrendo a bases de dados como o Pubmed e o Google Académico selecionando os artigos publicados entre 2010 e 2020. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave, em combinações variadas: “probiotics”, “microbiota”, “dysbiosis” “obesity”, “diarrhea”, “inflammatory bowel disease”, “psychobiotics”, “crohn’s disease”, “irritable bowel syndrome”, “next generation probiotics”. A pesquisa decorreu entre outubro de 2019 e julho de 2020 e os artigos incluídos foram no total 111. Os critérios de inclusão/exclusão foram a língua, o ano de publicação e o fator de impacto das revistas científicas. Foram incluídos apenas artigos em inglês, publicados entre 2010 e 2020 em revistas com pelo menos 3 de fator de impacto.

II. Microbiota Humano

1. Composição e variabilidade entre populações

Estima-se que façam parte do microbiota humano entre 10 a 100 triliões de microrganismos que vivem em simbiose com cada ser humano. A grande maioria habita no intestino, cujo genoma coletivo, o microbioma, contém 3,3 milhões de genes (Ursell, Metcalf et al. 2012).

O microbiota intestinal, em especial, é considerado um órgão essencial, estando envolvido em processos biológicos básicos que incluem modulação do fenótipo metabólico, regulação do desenvolvimento epitelial e influência na imunidade inata (Wang, Yao et al. 2017).

O desenvolvimento e maturação do microbiota intestinal é um processo dinâmico influenciado por diversos fatores como o tipo de parto, o tipo de alimentação e o uso de antibióticos (Patel and DuPont 2015).

Outros fatores maternos, incluindo stress pré-natal e o prolongamento do tempo de gestação têm também um papel relevante na colonização do microbiota intestinal dos recém-nascidos (Li, Wang et al. 2016).

A colonização microbiana do trato gastrointestinal (TGI) começa imediatamente após o nascimento e este processo pode determinar a predisposição para desenvolver algumas doenças ao longo da vida (Salazar, Valdés-Varela et al. 2017).

Os bebés nascidos por parto vaginal apresentam colonização do intestino por bactérias associadas à vagina como *Lactobacillus* e *Prevotella*. (Milani, Duranti et al. 2017). Por outro lado, bebés nascidos por cesariana apresentam um perfil microbiano semelhante ao microbiota cutâneo da mãe, incluindo *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium spp.* O microbiota destes bebés é menos diversificado e a colonização tardia de *Bacteroidetes* torna-os vulneráveis a certos agentes patogénicos e com maior predisposição para doenças alérgicas (Adak and Khan 2019).

Nos nascimentos por parto vaginal, o microbiota fecal assemelha-se ao das suas mães em 72% enquanto nos bebés nascidos por cesariana essa percentagem é de 41% (Thursby and Juge 2017).

O tipo de alimentação é outro fator que influencia a composição do microbiota (Bäckhed, Roswall et al. 2015). O leite materno cria um ambiente favorável para *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Por sua vez, o leite artificial está associado a um microbiota mais diversificado, sendo predominantes *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* e o género *Atopobium* (Milani, Duranti et al. 2017).

A etapa da transição do aleitamento para alimentos sólidos corresponde ao estabelecimento de um microbiota semelhante ao encontrado em adultos. Nesta fase da vida, o microbiota é constituído por representantes de *Actinobacteria*, *Verrucomocrobia*, entre outros e dominado por *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Donaldson, Lee et al. 2016).

A composição e variabilidade do microbiota intestinal está associado ao estilo de vida, fortemente influenciado pela dieta. Além disso, os fatores ambientais como zona geográfica e biodiversidade ecológica, também contribuem para a composição do microbiota intestinal (Jha, Davenport et al. 2018).

Vários estudos populacionais revelaram a dieta como fator determinante na variação do microbiota entre indivíduos. As mudanças cíclicas no microbiota intestinal humano resultantes da variação sazonal na dieta, especialmente em pessoas que vivem em sociedades tradicionais, é um excelente exemplo de como a dieta é decisiva para moldar o microbiota. A sua interferência no microbiota pode afetar o desenvolvimento e a progressão das doenças. Outro fator importante que leva a mudanças na dieta e alterações posteriores do microbiota é a urbanização. A urbanização pode levar à perda de diversidade do microbiota devido às mudanças na dieta, ao uso de antibióticos, aumento de poluição e higiene melhorada. Por outro lado, este fator também contribui para o aumento da variabilidade interindividual do microbiota intestinal nas sociedades (Kolodziejczyk, Zheng et al. 2019).

A composição do microbiota no trato gastrointestinal reflete as propriedades fisiológicas de cada região do intestino e é afetada por gradientes químicos, nutricionais e imunológicos ao longo deste órgão (Thursby and Juge 2017). O microambiente é variável ao longo do trato gastrointestinal quer no eixo longitudinal como no eixo transversal

(Figura 1) e a identificação das espécies residentes é importante para compreender a etiologia de determinadas doenças (Flynn, Ruffin et al. 2018).

Dominant gut phyla:

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

Predominant families in the:

Small intestine

Lactobacillaceae,
Enterobacteriaceae

Colon

Bacteroidaceae, Prevotellaceae,
Rikenellaceae, Lachnospiraceae,
Ruminococcaceae

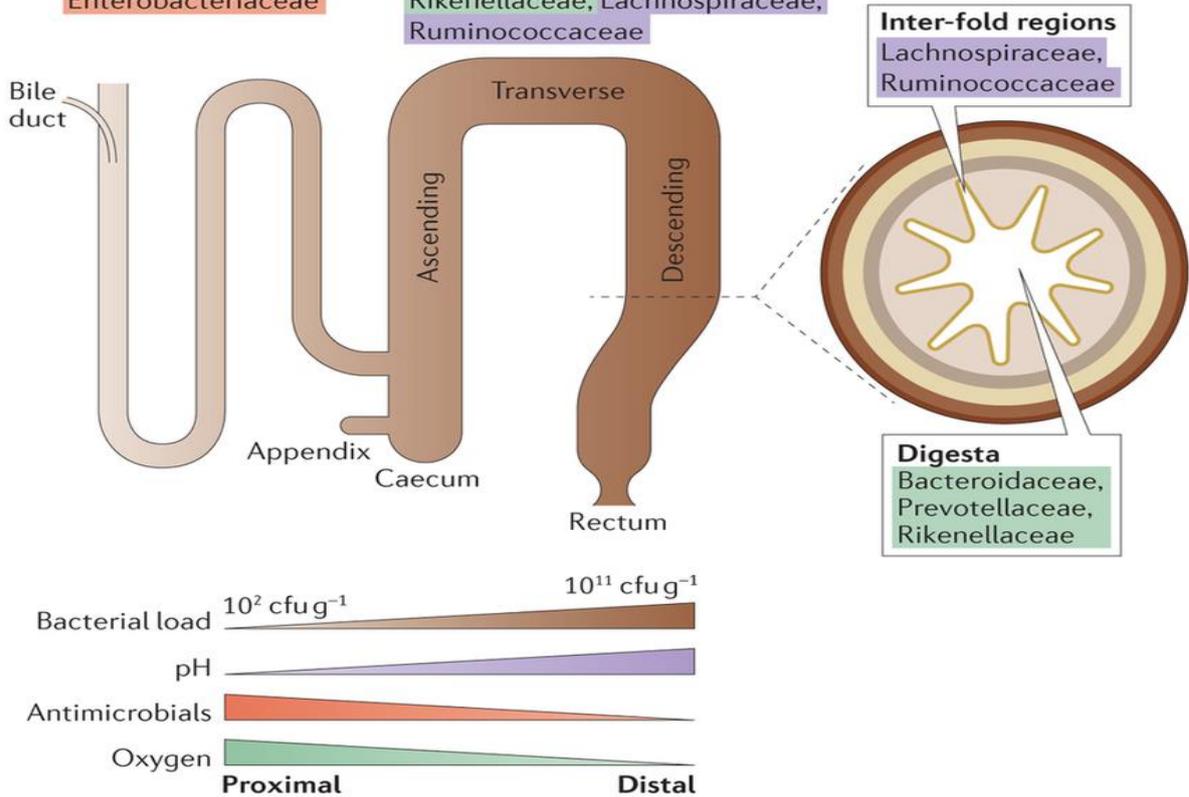


Figura 1 - Composição do microbiota intestinal (Donalson, Lee et al 2016).

O intestino delgado divide-se em três partes: duodeno, jejuno e íleo e nesta região ocorre a digestão e absorção de alimentos e nutrientes. No duodeno, o trânsito dos alimentos é mais rápido e a riqueza em oxigénio restringe a diversidade e densidade bacterianas (10^3 – 10^4 UFC/ml). A existência de ácidos biliares, secreções pancreáticas e agentes antimicrobianos caracterizam o microambiente deste segmento do trato gastrointestinal. Os filos predominantes no duodeno são *Firmicutes* e *Actinobacteria*. No jejuno a colonização bacteriana é mais diversa e aumenta a sua densidade (10^3 – 10^7 UFC/ml). Verifica-se, principalmente, o crescimento de aeróbios de Gram-positivo e anaeróbios

facultativos tais como *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (Adak and Khan 2019).

A densidade bacteriana atinge até 10^9 UFC/ml na transição para o íleo onde há abundância de espécies aeróbias. Por outro lado, na parte distal do íleo junto à válvula ileocecal predominam microrganismos semelhantes aos que colonizam o cólon como anaeróbios e espécies de Gram negativo (Adak and Khan 2019).

Por sua vez, no intestino grosso o trânsito dos alimentos é mais lento e ocorre a fermentação de alimentos não digeridos no intestino delgado (Tropini, Earle et al. 2017).

Esta secção gastrointestinal é dominada, principalmente, por *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. A proporção destes dois filos bacterianos pode ser considerada como um marcador indicativo de predisposição para o aparecimento de doenças metabólicas (Hollister, Gao et al. 2014).

No lúmen do intestino grosso, os géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus* são predominantes, estando os géneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Akkermansia* associados à mucosa (Adak and Khan 2019).

Apesar da suscetibilidade do microbiota aos vários fatores referidos acima, durante a vida adulta a sua composição permanece relativamente estável. Contudo, com o envelhecimento ocorrem modificações fisiológicas no trato gastrointestinal assim como mudanças nos padrões alimentares que se refletem em alterações na composição do microbiota. O microbiota intestinal de idosos é caracterizado por uma diversidade bacteriana reduzida e alterações nas espécies dominantes. Comparativamente ao microbiota de adultos mais jovens verificam-se, essencialmente, níveis mais baixos de *Firmicutes* e aumento de *Proteobacteria*. Em indivíduos idosos, as alterações do microbiota são associadas a fragilidade (Salazar, Valdés-Varela et al. 2017).

2. Funções e Benefícios do microbiota

A relação de simbiose entre o microbiota intestinal e o hospedeiro tem um profundo impacto em diferentes áreas da fisiologia humana. Além da componente metabólica, o microbiota assume também funções a nível estrutural e de proteção contra agentes patogénicos (Pickard, Zeng et al. 2017).

O microbiota pode realizar várias atividades metabólicas, nomeadamente catabolismo, bio-conversão de moléculas complexas e síntese de múltiplos compostos, com efeitos no microbiota e no hospedeiro (Young 2017).

O microbiota intestinal tem a capacidade de realizar a fermentação de hidratos de carbono complexos como a celulose, bem como de polissacarídeos não amiláceos e oligossacarídeos que são resistentes à digestão pelas enzimas do hospedeiro (Young 2017).

Membros dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* têm o maior conjunto de genes codificantes de enzimas responsáveis pela degradação de polissacarídeos, o que origina a libertação de gases (metano, hidrogénio e dióxido de carbono), produção de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) tais como acetato, propionato, butirato, valerato, isovalerato e hexanoato, ácidos orgânicos (lactato e succinato) e álcoois (metanol e etanol). Os ácidos gordos, quase na sua totalidade, são utilizados como fonte de energia e são absorvidos no cólon através de dois mecanismos: difusão ou troca iónica (Adak and Khan 2019).

A fonte de energia preferencial dos enterócitos é o butirato. Este ácido gordo tem múltiplos efeitos na fisiologia do hospedeiro, como efeitos anti-inflamatórios e atividade antitumoral (Young 2017). O butirato é também um regulador da homeostase energética, estimulando as células enteroendócrinas do intestino a ativar a produção de leptina por adipócitos, levando a sensação de saciedade (Nicholson, Holmes et al. 2012).

O acetato circula na corrente sanguínea e é uma fonte importante de energia, induzindo a formação de lípidos e estimulando a síntese hepática do colesterol. Constitui também uma fonte de energia para o tecido muscular e nervoso (Rivière, Selak et al. 2016).

No intestino grosso, a proteína não digerida é dividida em peptídeos, aminoácidos e outros metabolitos através de proteases bacterianas extracelulares e peptidases. Alguns desses metabolitos são absorvidos pelas células epiteliais e outros passam do lúmen intestinal até à corrente sanguínea atingindo os tecidos periféricos e exercendo efeitos biológicos. A disponibilidade de proteína na dieta em proporção com os hidratos de carbono determina as vias catabólicas utilizadas pela comunidade microbiana intestinal. Algumas bactérias têm a capacidade de sintetizar compostos neuroativos, incluindo neurotransmissores. Pode destacar-se o ácido γ -aminobutírico (GABA), (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* e *Lactococcus lactis*), noradrenalina (*Escherichia spp.* e *Bacillus spp.*), dopamina (*Bacillus spp.*), histamina e serotonina (*Streptococcus spp.*, *Escherichia spp.* e *Enterococcus spp.*) Estes produtos resultantes do metabolismo das proteínas sugerem ter um papel preponderante na modulação do eixo intestino-cérebro (Portune, Beaumont et al. 2016).

Uma dieta rica em gordura induz disbiose microbiana originando alterações nos principais filos do microbiota intestinal. Estudos experimentais revelaram uma diminuição de *Bacteroidetes* e um aumento em *Firmicutes* e *Proteobacteria*. As consequências associadas a este desequilíbrio do microbiota são significativas, destacando-se a promoção da obesidade e distúrbios metabólicos (Murphy, Velazquez et al. 2015).

Os ácidos biliares são produtos finais do catabolismo do colesterol e a sua transformação é realizada principalmente por bactérias anaeróbias dos géneros *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Clostridium* (Clusters XIVa e XI) e numa fração menor por bactérias aeróbias como *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (Adak and Khan 2019). Alterações no metabolismo dos ácidos biliares podem ter efeitos sobre o metabolismo do colesterol e dos lípidos. Alterações no microbiota intestinal estão associadas a metabolismo lipídico alterado e doenças como obesidade, resistência à insulina, fibrose hepática e esteato-hepatite não alcoólica (Young 2017).

O microbiota intestinal é responsável pela síntese de vitaminas como vitamina K, riboflavina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina e vitamina B12. As bactérias ácido lácticas são fundamentais para a sua produção. O género *Bifidobacterium*, em particular, é o principal produtor de ácido fólico, uma vitamina envolvida em processos metabólicos vitais do hospedeiro, incluindo síntese e reparação de DNA (Thursby and Juge 2017).

O desenvolvimento de doenças metabólicas como obesidade e diabetes tipo 2 têm sido associado a alterações no metabolismo de ácidos biliares, ácidos gordos de cadeia curta, vitaminas e compostos fenólicos (Thursby and Juge 2017).

O microbiota intestinal desempenha uma função protetora que resulta da sua interação com o sistema imunológico ao nível do intestino. Os tecidos linfóides do intestino, incluindo tecido linfático associado ao intestino (GALT) e as placas de Peyer, foram desenvolvidos como resultado da relação de simbiose entre o microbiota e o hospedeiro. A barreira química associada à imunidade inata é representada pelo muco, péptidos antimicrobianos (AMP) e imunoglobulina A (IgA) (Adak and Khan 2019).

O muco é formado por glicoproteínas, as mucinas, produzidas pelas células caliciformes dando origem a uma camada viscosa no epitélio intestinal, que protege da adesão de agentes patogénicos. Os péptidos antimicrobianos, como as defensinas, lisozima C, fosfolipases e lectina tipo C são produzidos pelas células epiteliais, incluindo enterócitos e células Paneth e restringem o acesso dos agentes patogénicos ao epitélio (Takiishi, Fenero et al. 2017).

A IgA secretada (SIgA) exerce uma ação benéfica no epitélio intestinal, protegendo-o de toxinas entéricas e de microrganismos patogénicos. A sua produção envolve as células dendríticas CX3CR1+ das placas de Peyer. Estas capturam antígenos no lúmen intestinal que são transportados para a área interfolicular das placas. Por sua vez, as células dendríticas CD103+ interagem com linfócitos T reguladores (Treg) que levam a produção de IgA pelos linfócitos B. Assim, o microbiota intestinal induz a ativação dos linfócitos Treg os quais induzem a secreção de IgA. A transcitose da IgA para o lúmen resulta na neutralização de toxinas microbianas e no bloqueio do acesso bacteriano a recetores epiteliais. Além disso, facilita a remoção bacteriana por estimulação da atividade peristáltica e mucociliar (Adak and Khan 2019).

O desequilíbrio da composição do microbiota pode levar ao aumento da permeabilidade intestinal e comprometer a função estrutural de barreira, desencadeando processos patológicos. Esta função de barreira é assegurada por uma camada única de células colunares que estão fortemente ligadas entre si por complexos de junção intercelulares. Estudos com administração de estirpes de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* revelaram um aumento da expressão das proteínas das junções apertadas, como a ocludina, ou melhoria da função barreira (Alam and Neish 2018).

A influência do microbiota intestinal na neurofisiologia do hospedeiro, nas funções do sistema nervoso e no comportamento humano tem gerado grande interesse. As atividades do microbiota intestinal podem controlar o sistema nervoso através da regulação da resposta imunitária e contribuem para a etiologia de distúrbios comportamentais como ansiedade, depressão, transtorno do espectro autista e doenças como doença de Alzheimer ou doença de Parkinson (Bermúdez-Humarán, Salinas et al. 2019).

3. Distúrbios do Microbiota – Disbiose

A manutenção do equilíbrio do microbiota intestinal é essencial para a homeostase e saúde humanas (Zeng, Inohara et al. 2017).

Nos últimos anos, muitas das doenças multifatoriais como diabetes mellitus, obesidade, alergias, asma, doenças neurodegenerativas e doença inflamatória intestinal têm sido associadas a uma anormal composição do microbiota (Lloyd-Price, Abu-Ali et al. 2016).

A disbiose define-se como uma alteração a nível da composição e da função do microbiota, devido a um conjunto de fatores ambientais e relacionados com o hospedeiro, que perturbam o ecossistema microbiano (Levy, Kolodziejczyk et al. 2017). Pode ser causada por alterações na dieta, inflamação, deficiência imunológica, infeção ou exposição a antibióticos ou toxinas (Zeng, Inohara et al. 2017).

A caracterização da disbiose poderá ajudar na identificação da patologia (Tabela 1).

Tabela 1 - Exemplos de disbiose associada a patologia (adaptado de (Peterson, Sharma et al. 2015)).

Patologia	Disbiose
Doença de Crohn	↑ bactérias enteropatogénicas (<i>E.coli</i>) ↑ <i>Enterobacteriaceae</i> ↓ <i>Firmicutes</i> (Colo-retal: ↑ <i>Firmicutes</i>) ↓ <i>Bifidobacteria</i> ; <i>Roseburia</i> ; <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ; <i>Lachospiraceae</i>
Colite Ulcerosa	↓ diversidade microbiana ↑ bactérias enteropatogénicas (<i>E.coli</i>) ↑ <i>Helicobacteraceae</i> ↓ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Cancro colorretal	↑ <i>Citrobacter spp.</i> ; <i>Shigella spp.</i> ; <i>Salmonella spp.</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Fusobacterium spp.</i>
Obesidade	Razão <i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroides</i> ↑ ↑ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Diabetes tipo I	↓ diversidade microbiana Razão <i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroides</i> ↓

Geralmente, a disbiose apresenta uma ou mais das características seguintes (Figura 2) (Levy, Kolodziejczyk et al. 2017) (DeGruttola, Low et al. 2016) (Petersen and Round 2014) :

- a) crescimento anormal de bactérias que estão tipicamente em baixas concentrações (patobiontes);
- b) redução ou perda total de microrganismos residentes;
- c) perda de diversidade.

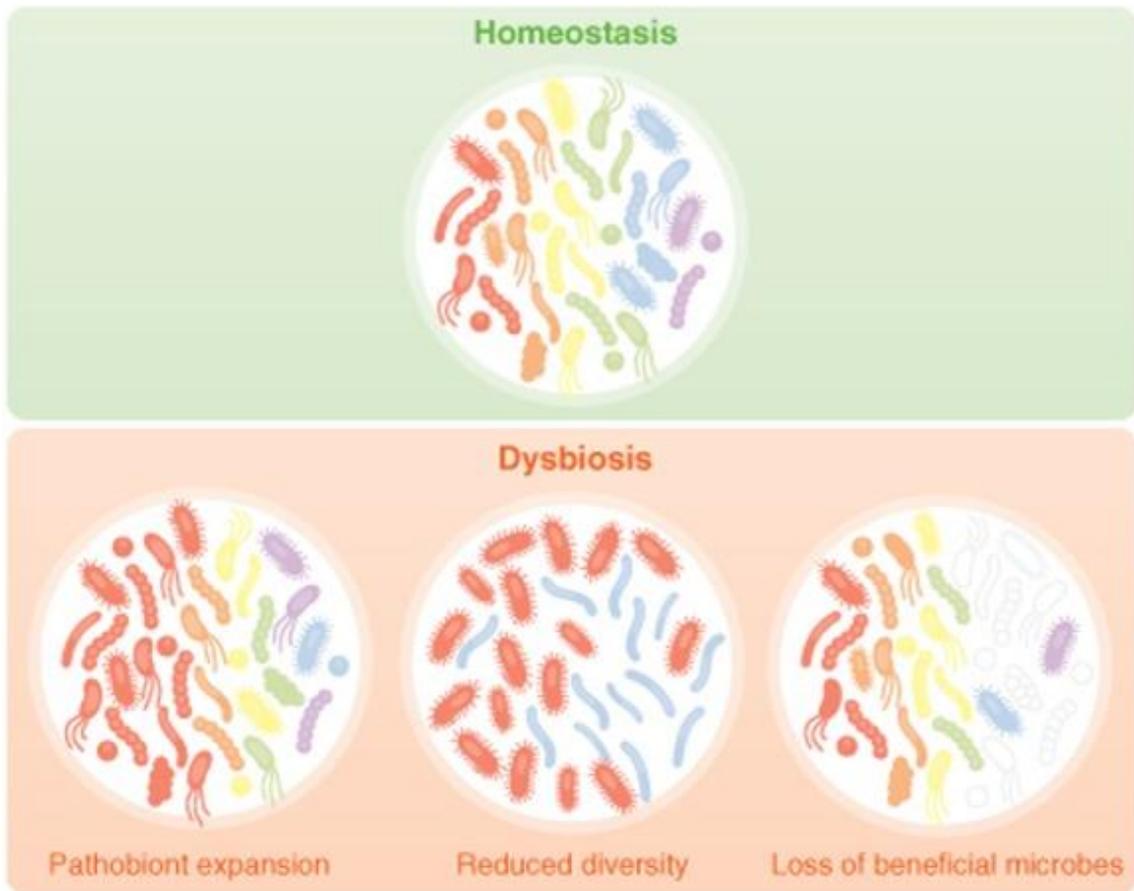


Figura 2 - Caracterização de disbiose (Petersen and Round 2014).

O crescimento atípico da família *Enterobacteriaceae* é um exemplo de desequilíbrio da composição do microbiota. Estas bactérias estão tipicamente presentes em baixas concentrações, no entanto, proliferam quando ocorrem alterações no ecossistema intestinal. A expansão destes microrganismos patobiontes, com potencial para causar patologia, é observada com regularidade em situações de infeção entérica e inflamação (Stecher, Maier et al. 2013).

Além disso, esta família de microrganismos também se encontra presente em patologias como cancro colorretal, doença celíaca e ainda em tratamentos com antibióticos ou casos de obesidade. Um aumento da prevalência de *Enterobacteriaceae*, incluindo *Escherichia coli* Aderente-Invasiva (AIEC), também é encontrado em pacientes com doença de Crohn (DC) ou colite ulcerosa (CU), as duas formas de doença inflamatória intestinal (DII) (Zeng, Inohara et al. 2017).

Devido à redução da diversidade associada à disbiose ocorrem mudanças no fluxo metabólico das bactérias e na interação com o sistema imunológico do hospedeiro. Muitos microrganismos anaeróbios do microbiota saudável são responsáveis pela produção de ácidos gordos de cadeia curta através da fermentação de hidratos de carbono complexos, incluindo espécies das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, como *Faecalibacterium prausnitzii*. Estes estão entre os grupos cujas abundância relativa diminui acentuadamente em situação de disbiose (Kriss, Hazleton et al. 2018).

III. Probióticos e Promoção da saúde

1. Perspetiva histórica

A palavra probiótico deriva do grego e significa “pró-vida” (Markowiak and Slizewska 2017).

O uso de probióticos remonta a um período anterior à descoberta dos microrganismos. Nos hieróglifos egípcios foram retratados produtos lácteos fermentados e os nómadas tibetanos usavam leite fermentado de iagues para preservar o leite nas suas longas caminhadas (Markowiak and Slizewska 2017).

No início do século XX, Elie Metchnikoff atribuiu a longevidade dos búlgaros ao seu elevado consumo de leite fermentado (Butel 2014).

Os trabalhos de pesquisa de Elie Metchnikoff, vencedor de Prémio Nobel, estão na génese dos probióticos. No seu livro de 1908 “The Prolongation of Life” postulou que as bactérias produtoras de ácido láctico presentes no leite fermentado conferem benefícios para a saúde. Mais tarde, estas bactérias viriam a ser denominadas por *Lactobacillus bulgaricus* (Hume 2011).

Na mesma altura, em 1906, um pediatra francês, Henry Tissier, isolou bactérias de Gram positivo com morfologia peculiar em forma de “y” a partir de fezes de recém-nascidos. Estas bactérias, que Tissier designou por *Bifidus*, eram predominantes nas fezes de crianças saudáveis, ao passo que existiam em pouca quantidade nos lactentes com diarreia (Butel 2014).

Em 1954, o termo “probiótico” terá sido usado, pela primeira vez, por Ferdinand Vergin, num artigo que comparava os efeitos dos antibióticos com outros agentes antibacterianos do microbiota intestinal com efeitos benéficos (“Probiotika”) (Markowiak and Slizewska 2017).

Lilly and Stillwell, em 1965, descrevem probióticos como microrganismos que estimulam o crescimento de outros microrganismos (Lilly and Stillwell 1965).

Parker, em 1974, usou o termo probiótico para descrever “organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal”. Posteriormente, Ray Fuller redefiniu probióticos como sendo microrganismos vivos com efeitos benéficos para a saúde do microbiota intestinal (Fuller 1986).

A definição atual, formulada pela Food and Agriculture Organization (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), sustenta que probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

2. Propriedades

A eficácia dos probióticos depende de alguns requisitos: causar efeito benéfico no hospedeiro; não causar patogenicidade, toxicidade ou efeitos adversos; ter a capacidade de sobreviver no TGI (*in vitro* e *in vivo*) e ser garantido o número de células viáveis desde o processo de fabrico, armazenamento até à sua administração para produzir os efeitos desejáveis (Fontana, Bermudez-Brito et al. 2013).

Os probióticos podem ser isolados de laticínios e produtos lácteos, do leite humano ou do TGI de humanos. No entanto, novas fontes de isolamento têm sido estudadas para evitar a utilização de produtos lácteos devido ao crescente número de intolerantes à lactose. Estas fontes de isolamento menos convencionais incluem alimentos fermentados, bebidas fermentadas, legumes ou frutas (Sornplang and Piyadeatsoontorn 2016).

As bactérias com potencial probiótico são isoladas e recorre-se a técnicas de sequenciamento genético baseadas no gene do rRNA 16S para a identificação das espécies (Fontana, Bermudez-Brito et al. 2013).

Para a seleção dos probióticos é relevante ter em conta os efeitos no hospedeiro da administração das estirpes selecionadas, nomeadamente, na modulação do sistema imunitário, produção de metabolitos benéficos e influência no desenvolvimento de doenças. Para além destes efeitos, a avaliação do potencial das estirpes probióticas está sujeita a vários outros critérios (Figura 3) (Papadimitriou, Zoumpopoulou et al. 2015) (de Melo Pereira, de Oliveira Coelho et al. 2018):

- Tolerância ao stress relacionada com as condições gastrointestinais desfavoráveis;
- Capacidade de adesão relacionada com a fixação no TGI;
- Atividade antimicrobiana associada à produção de metabolitos e competição com agentes patogénicos;
- Avaliação do perfil de segurança como a produção de enterotoxinas e o risco de transferência de genes de resistência a antibióticos;
- Testes clínicos para validar a segurança e eficácia.

As propriedades como a viabilidade celular, as técnicas de processamento e conservação também são importantes para a eficácia dos probióticos. A caracterização genómica, transcriptómica, proteómica e metabolómica é fundamental na compreensão das múltiplas interações com o hospedeiro (de Melo Pereira, de Oliveira Coelho et al. 2018).

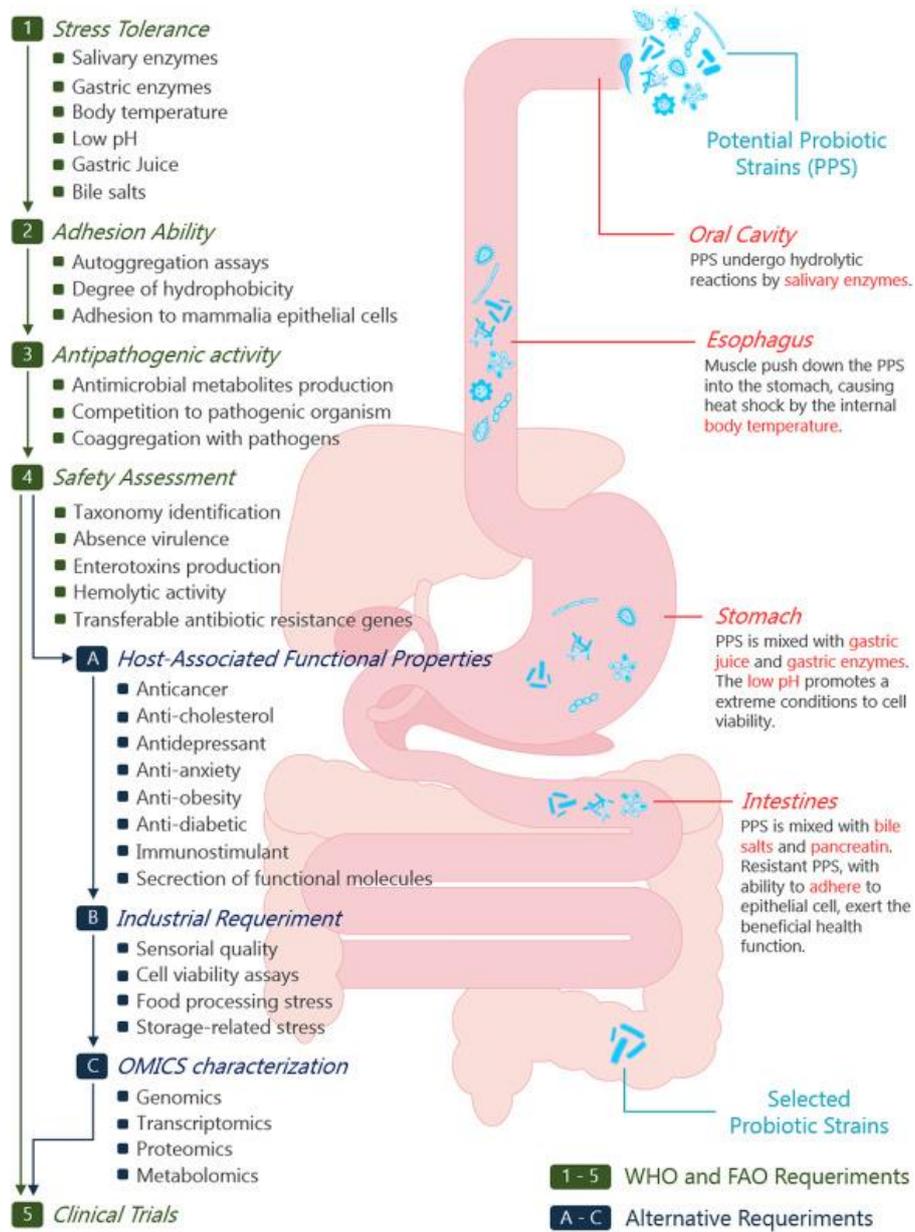


Figura 3 - Seleção de probióticos (de Melo Pereira, de Oliveira Coelho et al. 2018).

3. Microrganismos relevantes usados como probióticos

Atualmente existem vários microrganismos utilizados como probióticos (Tabela 1). As bactérias ácido lácticas (BAL), *Bifidobacterium*, *Bacillus* e leveduras, estão entre os microrganismos mais utilizados.

Tabela 2 - Principais microrganismos utilizados como probióticos (adaptado de (Markowiak and Ślizewska 2017) (Douillard and de Vos 2019))

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outros microrganismos	Nova geração
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
<i>L. reuteri</i>			<i>Bacteroides xylanisolvens</i>
<i>L. rhamnosus</i>			

O grupo das BAL foi o probiótico mais antigo descoberto. Este grupo de bactérias de Gram positivo em forma de bastão inclui 12 géneros, entre os quais o género *Lactobacillus*, e compreende 183 espécies reconhecidas. Metabolicamente caracterizam-se pela produção de ácido láctico a partir de hidratos de carbono proporcionando um ambiente ácido que inibe o crescimento de várias espécies de bactérias nocivas. Podem também produzir metabolitos secundários, incluindo bacteriocinas, exopolissacarídeos e enzimas, usadas para aumentar a qualidade e prazo de validade dos alimentos fermentados. *Lactobacillus*, incluem *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. satsumensis*, and *L. johnsonii* e são o grupo dominante no trato digestivo humano. Outros géneros de bactérias ácido lácticas com ação probiótica provada incluem *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, and *Leuconostoc*. (de Melo Pereira, de Oliveira Coelho et al. 2018)

Os microrganismos do género *Bifidobacterium* são de Gram positivo e pertencem ao filo *Actinobacteria*. Atualmente, este género, é constituído por 80 espécies distribuídas pelo trato gastrointestinal de seres humanos, cavidade oral, outros mamíferos, aves, insetos e águas residuais (Turroni, Duranti et al. 2014, Turroni, Duranti et al. 2019)

Estes microrganismos produzem ácidos gordos de cadeia curta como produtos finais da degradação de hidratos de carbono, especificamente lactato e acetato. Estes compostos podem influenciar a inflamação local por interferirem com a síntese de citocinas inflamatórias, inibindo a síntese de TNF-alfa e IL-6 e estimulando a síntese da citocina anti-inflamatória IL-10 em macrófagos e neutrófilos (Sanders, Benson et al. 2018).

O desenvolvimento das tecnologias de sequenciação genética permitiu a caracterização em profundidade de estirpes probióticas e o conhecimento dos seus mecanismos de ação revelando genes associado a funções probióticas. Por exemplo, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* ou *Lactobacillus sakei* apresentaram alta diversidade intraespécies, sugerindo que as propriedades funcionais para o hospedeiro são dependentes da estirpe em causa (Douillard and de Vos 2019).

As leveduras são microrganismos que têm revelado um grande potencial para utilização como probióticos. O teor rico em proteínas, vitamina B, minerais e variados compostos imunoestimulantes são algumas razões para esse interesse. Estes microrganismos habitam o trato intestinal de humanos e encontram-se também em plantas e produtos alimentares. Em geral, exibem a vantagem de não-sensibilidade aos antibióticos e uma boa tolerância às condições de processamento industrial. A levedura *Saccharomyces boulardii* é a mais utilizada como probiótico e apresenta um excelente perfil de segurança. Outras leveduras como *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* e *Candida* estão a ser identificadas e reconhecidas pelo seu potencial como probióticos (de Melo Pereira, de Oliveira Coelho et al. 2018).

Apesar dos benefícios indicados anteriormente, as tendências atuais no desenvolvimento de probióticos vão no sentido de diminuir a utilização de grupos de probióticos tradicionais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e aumentar a utilização de microrganismos bem-adaptados ao intestino como *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, *Ruminococcus* e outros membros da *Lachnospiracea*. As características destes microrganismos, como a extrema sensibilidade ao oxigénio e a forte adaptação ao ecossistema intestinal dificultam gravemente a preparação de suplementos viáveis. No

entanto, estes microrganismos podem ser considerados a próxima geração de probióticos. A identificação de frações biologicamente ativas de tais microrganismos permitirá explorar novas possibilidades no que diz respeito à promoção da saúde (Delgado, Sánchez et al. 2020).

O recurso a ferramentas de biotecnologia e os conhecimentos nos vários níveis das ciências ómicas são importantes aliados para o aperfeiçoamento das estirpes probióticas existentes e para o desenvolvimento de novas estirpes (Figura 4) (Douillard and de Vos 2019).

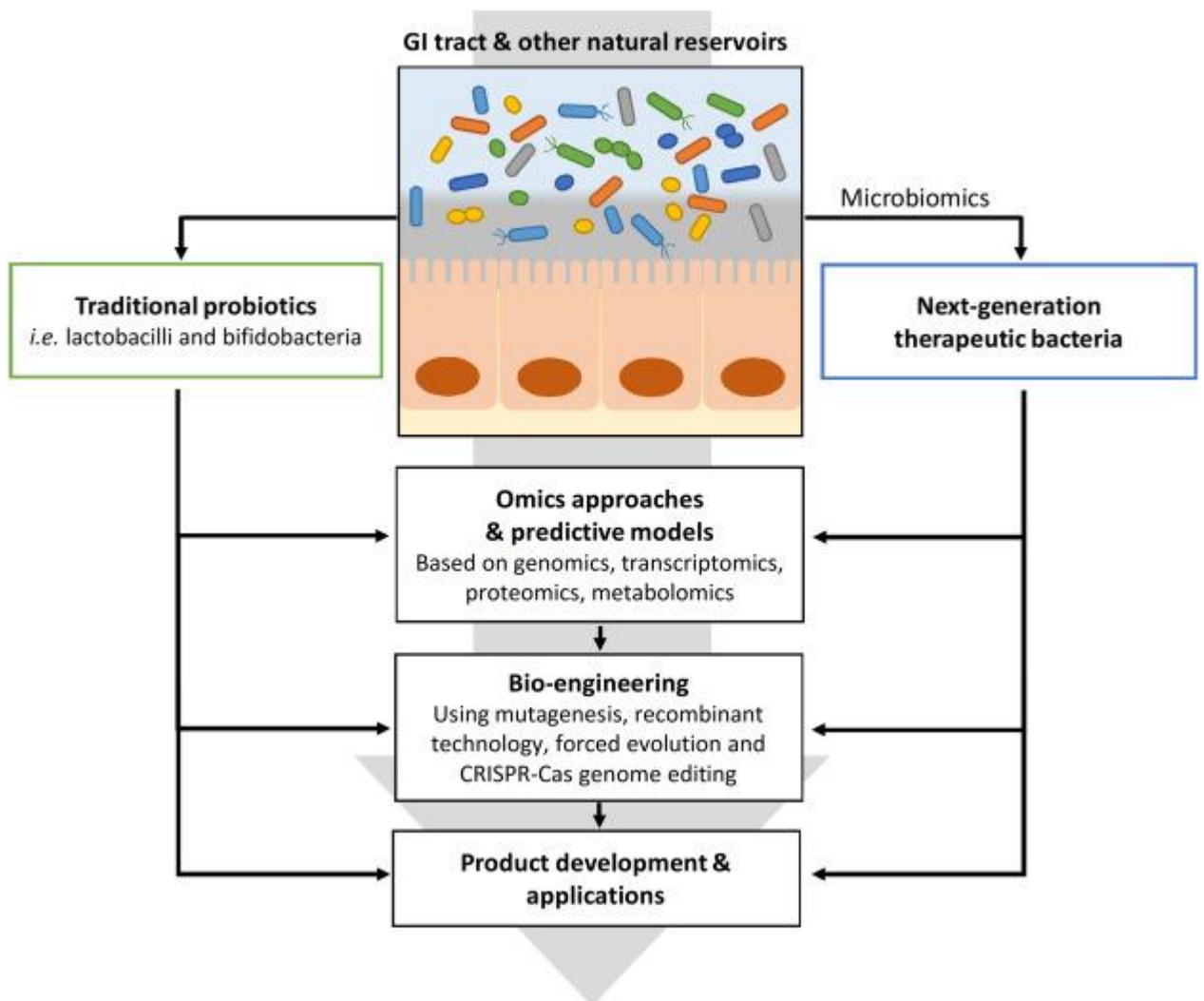


Figura 4 - Biotecnologia e outras tecnologias no desenvolvimento de probióticos

(Douillard and de Vos 2019).

4. Mecanismos de ação

Muitos mecanismos de ação dos probióticos são conhecidos com base em estudos realizados em culturas *in vitro*, em animais, culturas celulares ou modelos humanos *ex vivo*. No entanto, nem todos os mecanismos foram confirmados em humanos nem foram identificados os mecanismos de ação de todas as linhagens de probióticos. Embora vários mecanismos sejam provavelmente expressos em simultâneo num único probiótico, a importância de um mecanismo depende de muitos fatores (Sanders, Merenstein et al. 2019).

Os probióticos, de um modo geral, exercem os seus benefícios através de quatro diferentes mecanismos de ação (Sánchez, Delgado et al. 2017) (Sanders, Merenstein et al. 2019):

- modulação do sistema imunitário;
- interação com o microbiota intestinal;
- reforço da barreira epitelial intestinal;
- influência noutros órgãos do organismo através do sistema imunológico e da produção de neurotransmissores.

4.1. Modulação do sistema imunitário

Alguns probióticos demonstraram aumentar a fagocitose ou a atividade natural das células natural killer (NK). Alguns também demonstraram a capacidade de induzir a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e regular positivamente a secreção de anticorpos o que pode aumentar a resistência a agentes patogénicos (Patel and DuPont 2015). Algumas estirpes podem aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias como TNF- β com implicações na progressão do cancro do cólon e na colite (Sanders, Merenstein et al. 2019). Os probióticos, assim como outras bactérias, possuem compostos na sua superfície (“pathogen-associated molecular patterns” - PAMPs) que interagem com recetores nos fagócitos, denominados “pattern-recognition receptors” (PRR),

presentes na membrana de células epiteliais e dendríticas. Algumas das famílias de PRR presentes em células do sistema imunológico são recetores do tipo Toll (TLR), recetores do tipo NOD (NLR), recetores de lectina do tipo C ou recetores do tipo RIG-I. Esta interação dos microrganismos com os recetores celulares leva a ativação das células apresentadoras de antígenos, que ao apresentar antígenos a linfócitos T influenciam o tipo de resposta imunitária desenvolvida, que pode ser principalmente efetora (Th1, Th2 ou Th17) ou reguladora (Treg). A resposta imunitária mediada pelas células Treg está diretamente relacionada com a manutenção da homeostase do intestino e com o desenvolvimento de tolerância à microbiota residente. Os probióticos indutores da resposta imunitária mediada por Treg, assumem particular importância no quadro de DII e outras doenças inflamatórias. Em estudos com animais não colonizados por microrganismos (“germ-free”) foi observado que, após colonização com um microbiota modelo, ocorreu recrutamento de células Treg para a mucosa intestinal, o que é essencial para manter um baixo grau de inflamação (Sánchez, Delgado et al. 2017).

4.2. Interação com o microbiota intestinal

Os probióticos podem interagir com o microbiota intestinal através da produção de vários compostos com características antimicrobianas. Os microrganismos pertencentes aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* produzem ácidos láctico e acético como produtos finais do metabolismo dos hidratos de carbono. Estes ácidos orgânicos podem diminuir o pH luminal e impedir o crescimento de agentes patogénicos (Sanders, Merenstein et al. 2019).

Estirpes do género *Lactobacillus* são responsáveis pela produção de bacteriocinas. Estes compostos podem inibir a proliferação de outras estirpes do mesmo género, de outras bactérias de Gram positivo e de Gram negativo e mesmo de vírus e certos fungos (Patel and DuPont 2015).

Outro tipo de interação ocorre através da competição por nutrientes, de fenómenos de antagonismo, de alimentação cruzada e de promoção da estabilidade do microbiota

devido à diversidade de microrganismos. A ocorrência de fenómenos de antagonismo deve-se à produção de bacteriocinas que atuam contra certos grupos de microbiota. Por outro lado, alguns produtos de probióticos podem apoiar o desenvolvimento de outros grupos microbianos, como as bactérias do género *Bifidobacterium* que produzem acetato, o qual serve de fonte de energia para outros membros do microbiota intestinal, apoiando a alimentação cruzada (Sanders, Merenstein et al. 2019).

Outro aspeto de interação está relacionado com a capacidade de bactérias probióticas aderirem a células epiteliais, bloqueando a adesão de microrganismos patogénicos. Esta característica das estirpes probióticas pode desencadear também uma cascata de sinalização, levando à modulação da resposta imunológica no sentido de uma resposta reguladora (Markowiak and Śliżewska 2017).

4.3. Reforço da barreira epitelial intestinal

No trato intestinal, uma única camada de células epiteliais forma uma barreira entre o lúmen intestinal, a lâmina própria e o tecido linfático associado à mucosa. O muco secretado pelas células caliciformes no epitélio serve para, especialmente, compartimentar as bactérias no lúmen e evitar a colonização do epitélio (Bron, Kleerebezem et al. 2017).

A função da barreira intestinal é mantida pela produção de muco que reduz a ligação dos agentes patogénicos às células epiteliais (Sanders, Merenstein et al. 2019), pela secreção de cloreto e água e pelas junções apertadas que ligam as porções apicais das células epiteliais (Patel and DuPont 2015).

Os probióticos podem melhorar a função de barreira do muco através da interação com células do sistema imunitário da mucosa levando à produção de citocinas (por exemplo, IL-22, IL-8) que podem aumentar a expressão de genes específicos da mucina. Por exemplo, estudos *in vitro* demonstraram que *Lactobacillus spp.* estimulam a expressão de MUC3 nas células do epitélio intestinal humano, inibindo a adesão de bactérias patogénicas (Bron, Kleerebezem et al. 2017).

Também se demonstrou que vários microrganismos dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* induzem a expressão de proteínas das junções apertadas (Sanders, Merenstein et al. 2019), conferindo maior coesão ao epitélio intestinal.

Muitos agentes patogénicos influenciam a permeabilidade da barreira epitelial intestinal através da produção de toxinas que danificam as junções apertadas e/ou causam aumento da secreção ou diminuição da absorção de líquidos e eletrólitos. Os probióticos possuem mecanismos indiretos de manutenção da função barreira, contrariando a ação destas toxinas. Os microrganismos *Bifidobacterium breve* estirpe Yakult e *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM20439 foram descritos como inibidores da expressão da toxina Shiga em *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) 0157: H7 *in vitro*. Um outro mecanismo foi identificado em *Saccharomyces boulardii*, uma levedura que secreta uma protease que pode degradar a toxina A produzida pelo *Clostridium difficile*, impedindo que afete a barreira epitelial intestinal (Bron, Kleerebezem et al. 2017).

4.4. Efeitos em diferentes órgãos através da regulação do sistema imunológico e da produção de neurotransmissores

As espécies probióticas podem produzir pequenas moléculas com efeitos diferentes no hospedeiro e no seu microbiota. Como exemplos destas moléculas pode referir-se a produção de neurotransmissores como oxitocina, GABA, serotonina, triptamina, noradrenalina, dopamina e acetilcolina (Sanders, Merenstein et al. 2019).

Algumas bactérias do género *Lactobacillus* são capazes de converter nitrato em óxido nítrico (NO), um potente regulador das respostas a diferentes níveis do sistema imunológico e nervoso. Além disso, aumentam a atividade da enzima indol-amina-2,3-dioxigenase (IDO), envolvida no catabolismo do triptofano (TRP) e na formação de compostos neuroativos (Bermúdez-Humarán, Salinas et al. 2019).

5. Aplicações clínicas

A utilização de probióticos em diversas indicações clínicas apresenta vários benefícios.

5.1. Patologias intestinais

5.1.1. Diarreia associada a antibióticos (DAA)

O microbiota intestinal normal é uma importante barreira contra bactérias patogénicas. O uso de antibióticos leva à sua disfunção e pode causar diarreia. A DAA é uma complicação comum em ambulatório e em hospitais e afeta um terço dos pacientes tratados com antibióticos. Define-se como diarreia que ocorre devido a antibioterapia e exclui outras etiologias. Clinicamente apresenta-se como diarreia leve, mas pode evoluir para uma colite pseudomembranosa fulminante (Lau and Chamberlain 2016).

Estudos revelaram que o uso de probióticos reduz em 51% o risco de DAA. As espécies analisadas foram *Lactobacillus rhamnosus GG* e *Saccharomyces boulardii* e verificou-se que existe evidência de relação dose-resposta (Blaabjerg, Artzi et al. 2017).

Uma revisão bibliográfica da Cochrane Database sobre probióticos usados na prevenção de DAA em crianças revelou que *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii* são eficazes em doses de 5-40 biliões de UFC, apresentando efeitos adversos raros (Wilkins and Sequoia 2017).

Em doentes com comorbilidades associadas, incluindo em doentes idosos, o agente responsável pela colonização do trato gastrointestinal é *Clostridium difficile* (Szajewska, Canani et al. 2016). Os probióticos, como terapêutica adjuvante, são considerados para a prevenção da infeção por este microrganismo e das suas complicações. Numa meta-análise, a toma de probióticos foi associada a 60,5% de redução de incidência de diarreia

associada a *Clostridium difficile* (CDAD). O uso de *Lactobacillus*, *Saccharomyces* e uma mistura de diferentes probióticos reduziu significativamente o risco de CDAD (63,7%, 58,5% e 58,2% de redução de risco, respetivamente). Entre adultos houve 59,5% de redução de risco e entre crianças de 65,9% (Lau and Chamberlain 2016).

5.1.2. Doença inflamatória intestinal (DII)

A DII que abrange a DC e a CU é uma patologia crónica caracterizada por distúrbios inflamatórios recidivantes no trato gastrointestinal. Apesar da elevada prevalência, a sua etiologia precisa permanece desconhecida. Estudos revelam que alterações a nível da microbiota estão associados a patogénese da doença inflamatória intestinal. A redução da diversidade do microbiota, a diminuição de *Firmicutes* e de bactérias produtoras de SCFA conduzem a disbiose na DII. Além destes fatores, o aumento de bactérias mucolíticas, de bactérias redutoras de sulfato e bactérias patogénicas levam também a disbiose (Nishida, Inoue et al. 2018).

A DII é uma doença inflamatória crónica do trato gastrointestinal que pode resultar da interação entre vários fatores como: suscetibilidade genética, fatores ambientais e microbiota intestinal alterada. O quadro clínico típico traduz-se em dor abdominal, diarreia crónica, perda de peso e fadiga. Habitualmente, os jovens são os pacientes mais afetados (Torres, Mehandru et al. 2017).

Num estudo duplo cego, foi avaliado o uso de probióticos para induzir a remissão da CU e também para apoiar a manutenção da remissão. Neste estudo foi comparado o fármaco messalazina com uma preparação oral de *E. coli* viável Nissle (sorotipo 06: K5: H1). Foi avaliada a sua eficácia na prevenção de recaída da doença durante um período de 12 semanas. Verificou-se que o tratamento com o probiótico foi equivalente à utilização do fármaco messalazina (Bron, Kleerebezem et al. 2017).

VSL#3 é uma mistura de probióticos de dose elevada que contém quatro estirpes de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), três estirpes de *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve* e *B. infantis*) e uma estirpe de

Streptococcus sulivarius subsp. *Thermophiles*. Uma meta-análise revelou que esta mistura de probióticos quando adicionada à terapia convencional numa dose diária de $3,6 \times 10^{12}$ UFC/dia, é segura e mais eficaz do que a terapia convencional isolada para alcançar resposta e remissão em CU leve a moderadamente ativa (Mardini and Grigorian 2014). O VSL#3 pode ser eficaz na indução da remissão na CU ativa (Derwa, Gracie et al. 2017), embora deva ser encarado como terapêutica coadjuvante e sinérgica, em vez de substituir a terapia convencional com 5-aminosalicilatos (5-ASA). Pode ser também eficiente na prevenção da recaída da CU (Derwa, Gracie et al. 2017).

A administração de VSL#3 leva a uma diminuição do TNF- α e da IL-6 e a um aumento da interleucina IL-10, o que resulta numa atividade anti-inflamatória. Além disso, a terapêutica com VSL#3 melhora ainda a função barreira do epitélio intestinal. A eficácia superior do VSL#3 pode ser explicada pela combinação de múltiplas estirpes probióticas (contém 8 estirpes) que tem um efeito de preservação da barreira epitelial mais forte do que uma estirpe isolada (Shen, Zuo et al. 2014).

Relativamente à DC, os estudos não revelaram evidência suficiente que sugira um benefício decorrente do uso de probióticos (Shen, Zuo et al. 2014) (Derwa, Gracie et al. 2017) (Abraham and Quigley 2017).

5.1.3. Cancro colorretal (CCR)

O CCR é um dos mais comuns e diagnosticados no mundo. Existem múltiplos fatores associados ao aparecimento desta patologia, por exemplo, predisposição genética, tabagismo ou uma dieta rica em carne vermelha e processada e escassa em vegetais e frutas. Os probióticos podem ser úteis na prevenção do cancro e podem ser coadjuvantes durante o seu tratamento (Molska and Reguła 2019).

A eficácia de microrganismos do género *Lactobacillus*, incluindo *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e de outros géneros como *B. lactis* e *B. longum* foi estudada em pacientes com CCR. Os resultados revelaram que houve redução da proliferação e crescimento de células cancerígenas e redução da resposta inflamatória.

Além disso, estes probióticos melhoraram a integridade da mucosa intestinal, produziram efeitos estimulantes sobre o sistema imunológico e preveniram as metástases. *L. casei* impede tumores colorretais atípicos e *L. rhamnosus* reduz a dor abdominal em pacientes com CCR devido à quimioterapia com 5-fluoracilo. Outros estudos foram realizados com *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. tetragenous* e *E. faecalis* e reduziram a infecção no local cirúrgico e no pós-operatório e a septicemia associada à intervenção. Por outro lado, verificou-se um aumento no nível de anticorpos protetores da classe IgG e SIgA (Eslami, Yousefi et al. 2019).

Mais recentemente outras estirpes foram estudadas como *L. brevis*, *L. lactis*, *B. breve*, *B. infantis*, *S. boulardii*, *S. thermophilus* e *Leuconostoc mesenteroides*. Estes probióticos estudados reduziram o risco de complicações pós-operatórias, de diarreia e enterocolite em pacientes com CCR (Eslami, Yousefi et al. 2019).

A administração de estirpes probióticas pode reduzir os efeitos adversos da terapia antitumoral, especialmente após procedimentos cirúrgicos, quimioterapia e radioterapia. A radioterapia provoca diarreia nestes pacientes, conhecida por diarreia induzida pela radiação. Num estudo duplo cego e controlado por placebo, foi demonstrado que a administração do VSL#3 (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *S. thermophilus*) poderia reduzir o risco de diarreia em pacientes que receberam radioterapia após cirurgia de cancro colorretal (Kaźmierczak-Siedlecka, Daca et al. 2020).

Os probióticos da próxima geração como *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Akkermansia muciphila* e *Faecalibacterium prausnitzii* abriram novas perspetivas terapêuticas para o CCR. Algumas estirpes de *Bifidobacterium* podem melhorar a eficácia da terapia antitumoral baseada em imunoterapia, bem como *A. muciphila*, que é uma das espécies mais abundantes no intestino humano. Atualmente, estas estirpes de nova geração são consideradas como uma nova estratégia terapêutica para o tratamento de CCR. No entanto, mais estudos serão necessários para esclarecer os mecanismos de ação e explorar hipóteses de tratamento (Kaźmierczak-Siedlecka, Daca et al. 2020).

5.1.4. Síndrome do cólon irritável (SCI)

O SCI é um distúrbio gastrointestinal frequente que provoca sintomas como inchaço, flatulência, dor abdominal ou desconforto relacionado com mudança nos hábitos intestinais, alternando em episódios de diarreia, obstipação ou ambos (Dale, Rasmussen et al. 2019).

Este distúrbio está associado a múltiplos fatores como variantes genéticas, ambientais e psicossociais. Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo aparecimento de sintomas são variados e incluem alterações da motilidade gastrointestinal, hiperalgesia visceral, aumento da permeabilidade intestinal, ativação da resposta imunitária, microbiota alterada e distúrbios na função cérebro-intestino (Lacy, Mearin et al. 2016).

Alterações no microbiota parecem contribuir para a sintomatologia do SCI, uma vez que determinados perfis microbianos têm sido associados a sintomas particulares e à severidade da doença (Tap, Derrien et al. 2017).

Estudos em humanos e animais, com administração de determinadas estirpes de probióticos, revelaram melhoria da dor abdominal, redução da hipersensibilidade visceral, redução da secreção intestinal de citocinas e melhoria da função de barreira epitelial intestinal (Dale, Rasmussen et al. 2019).

A estirpe *Bifidobacterium infantis* 35624 foi também alvo de interesse pelos seus efeitos benéficos em estudos com animais que apresentavam alterações inflamatórias intestinais. Verificou-se que houve diminuição da dor ou desconforto abdominal, da distensão abdominal e da dificuldade do movimento intestinal após administração isolada deste probiótico. Estes resultados estão associados com a uniformização dos níveis de citocinas anti-inflamatórias e pro-inflamatórias, demonstrando que esta estirpe tem um papel de modulação do sistema imunológico (O'Mahony, McCarthy et al. 2005).

Numa revisão sistemática sugere-se que as estirpes *Lactobacillus plantarum* DSM 9843, *E. coli* DSM1752 e *Streptococcus faecium* apresentam benefícios na melhoria dos sintomas de SCI. Além destas, o género *Bifidobacterium* revela-se também promissor, tendo sido associado a redução dos níveis de dor (Ford, Harris et al. 2018) (Ford, Lacy et al. 2017). Uma estirpe em particular pertencente a este género, *Bifidobacterium longum*

NCC300, teve efeitos benéficos nos sintomas de depressão associados a SCI e melhoria da qualidade de vida destes pacientes (Pinto-Sanchez, Hall et al. 2017).

Noutra revisão sistemática mais recente há evidência que a utilização de probióticos é segura e proporciona melhoria dos sintomas de SCI comparativamente ao placebo. Os tratamentos de curta duração, com prazo inferior a oito semanas, demonstraram resultados positivos na redução do inchaço (Li, Liang et al. 2020).

5.2. Patologias Extraintestinais

5.2.1. Obesidade e doenças metabólicas

A obesidade é um problema de saúde emergente das sociedades atuais industrializadas. O aumento da sua incidência resulta da interação complexa entre genética e fatores ambientais tais como dieta e estilo de vida. O seu aparecimento resulta desta interação e de um desequilíbrio entre o aporte de energia e o seu gasto total. Este distúrbio aumenta a predisposição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes, esteato-hepatite não alcoólica, cancro, doenças relacionadas com o sistema imunitário e doenças músculo-esqueléticas (Gérard 2016) (WHO 2020).

O microbiota intestinal também é um dos fatores preponderantes para o desenvolvimento de obesidade. A sua composição influencia a aquisição de nutrientes por parte do hospedeiro e o equilíbrio energético, o que afeta a dinâmica de armazenamento de gordura nos adipócitos (Rosenbaum, Knight et al. 2015). Vários estudos associam alterações na abundância dos principais filos do microbiota diretamente com a obesidade. Assim, indivíduos obesos apresentam maior abundância de *Firmicutes* e menor abundância de *Bacteroidetes* (Abenavoli, Scarpellini et al. 2019).

Os probióticos têm sido alvo de um interesse crescente nesta área devido à sua capacidade de modular o microbiota intestinal do hospedeiro. Os efeitos positivos da sua

administração são considerados importantes na gestão da obesidade (Dahiya, Renuka et al. 2017).

Várias estirpes dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* demonstraram um impacto benéfico na obesidade (Tabela 3). Em estudos realizados com animais verificou-se a modulação da composição do microbiota intestinal por estas bactérias, tendo sido observado um aumento da produção de SCFA e melhoria do perfil lipídico (Sáez-Lara, Robles-Sanchez et al. 2016, Bianchi, Duque et al. 2019).

Tabela 3 - Efeitos de probióticos na obesidade (adaptado de (Bianchi, Duque et al. 2019) (Sáez-Lara, Robles-Sanchez et al. 2016))

Probiótico	Resultado
<i>Lactobacillus fermentum</i> FTDC 8312	↓ níveis séricos de colesterol total ↓ nível sérico de LDL ↑ nível sérico de HDL sem alterações no peso
<i>Lactobacillus plantarum</i> HAC01	↓ tecido adiposo do mesentério ↓ peso corporal ↓ <i>Bacteroides</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> GCL2505	↑ Géneros <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Clostridium</i> ↓ acumulação de gordura visceral ↑ níveis de acetato, propionato e peptídeo GPL-1 melhoria da tolerância à glicose
Mistura de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMG S-28148 e <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG P-28149	↑ produção de butirato e propionato ↑ <i>Akkermansia muciniphila</i> ↓ peso corporal e tecido adiposo epididimal
<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055	↓ IMC e gordura visceral ↓ perímetro cintura e anca ↑ níveis de adiponectina
VSL#3	melhoria do perfil lipídico e da sensibilidade à insulina

5.2.2. Distúrbios neurológicos

O microbiota intestinal regula vários aspetos da fisiologia do hospedeiro incluindo o desenvolvimento e as funções do cérebro e o comportamento (Fung, Olson et al. 2017).

O TGI e o sistema nervoso central estabelecem comunicação através de uma rede bidirecional conhecida como eixo intestino-cérebro. Deste complexo sistema neuro endócrino resultam respostas a nível do SNC que refletem informação transmitida pelo TGI. Esta comunicação pode ser afetada em situações de disbiose e dar origem a inflamação, aumento do stress oxidativo, desequilíbrio energético e aumento da degeneração celular (Westfall, Lomis et al. 2017).

A modulação deste multifacetado sistema desempenha um papel importante na etiologia e no aparecimento ou desenvolvimento de sinais ou sintomas associados a distúrbios neurológicos como transtorno do espectro autista, ansiedade, depressão, doença de Alzheimer ou doença de Parkinson (Fung, Olson et al. 2017).

Os tratamentos convencionais para estas patologias apresentam inúmeros efeitos secundários ou revelam-se pouco eficazes. O potencial dos probióticos nesta área tem sido objeto de vários estudos. O objetivo da sua utilização passa pela prevenção destas doenças e pelo alívio das comorbidades (Kioussi, Karapetsas et al. 2019).

Alguns autores empregam o conceito de psicobióticos que se refere a organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, produzem efeito benéfico na saúde mental. Sendo uma classe de probióticos, estes organismos têm a capacidade de produzir e fornecer compostos neuroativos como, por exemplo, GABA e serotonina (Dinan, Stanton et al. 2013, Yano, Yu et al. 2015).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e disfunções na sua via de sinalização estão associadas a ansiedade e depressão. Estudos *in vitro* demonstraram que estirpes dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são capazes de metabolizar glutamato a GABA (Foster and McVey Neufeld 2013).

Foi administrado em humanos um probiótico com *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175, cujos resultados comprovaram uma diminuição dos

sintomas de depressão e ansiedade (Messaudi, Lalonde et al. 2010, Messaudi, Violle et al. 2011).

Um estudo mais recente realizado em pacientes com perturbação depressiva major revelou melhoria nos resultados da escala de depressão de Beck. O probiótico alvo de estudo era composto por *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. bifidum* (Akkasheh, Kashani-Poor et al. 2016).

Noutro estudo com *Bifidobacterium longum* 1714 foi comprovado a redução dos índices de stress além de melhoria na memória, após quatro semanas de tratamento (Allen, Hutch et al. 2016).

Relativamente à doença de Parkinson, um estudo publicado recentemente recorrendo ao uso de probióticos revelou uma diminuição da pontuação na escala de classificação da doença em comparação com o grupo placebo. As estirpes utilizadas foram *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *L. reuteri* e *L. fermentum* (8×10^9 UFC/g) e o tratamento teve a duração de 12 semanas (Tamtaji, Taghizadeh et al. 2019).

Um estudo levado a cabo com ratos com doença de Alzheimer testou os efeitos dos probióticos na memória e nos biomarcadores de stress oxidativo. A suplementação com *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *B. lactis* e *B. longum* revelou melhoria na aprendizagem e na memória relativamente ao grupo placebo. Outros resultados comprovaram redução do número de placas amiloides, redução dos parâmetros associados a inflamação e stress oxidativo (Athari Nik Azm, Djazayeri et al. 2018).

5.2.3. Doenças alérgicas

As doenças alérgicas caracterizam-se por uma resposta inadequada do sistema imunológico a determinadas substâncias e englobam distúrbios respiratórios, cutâneos e alergias alimentares. O microbiota do trato respiratório, da pele e intestinal parecem ter um papel importante no desenvolvimento destas patologias e os probióticos podem assumir-se como uma ferramenta de prevenção ou como coadjuvantes no tratamento das doenças alérgicas (Pascal, Perez-Gordo et al. 2018).

O microbiota do pulmão, em particular, é fundamental no desenvolvimento de doenças alérgicas como asma ou rinite alérgica. Verificam-se diferenças na composição e na diversidade do microbiota deste órgão entre indivíduos saudáveis e indivíduos com estas doenças. Assim, encontra-se maior diversidade do microbiota do pulmão e uma elevada prevalência de microrganismos do filo Proteobacteria em indivíduos asmáticos (Di Cicco, Pistello et al. 2018).

Embora os efeitos dos probióticos em indivíduos com asma não estejam bem estabelecidos e a sua evidência bem esclarecida existem alguns estudos com resultados positivos (Sharma and Im 2018).

A estirpe *Lactobacillus gasseri* A5 foi avaliada num estudo randomizado em crianças com asma e rinite alérgica durante 8 semanas. Os resultados desta suplementação revelaram uma redução significativa dos sintomas associada a uma melhoria da função pulmonar (Chen, Jan et al. 2010).

Um estudo em ratinhos com asma induzida por ovalbumina revelou que a administração de *L. rhamnosus* GG teve um efeito benéfico na inflamação das vias aéreas. Deste modo, esta estirpe pode ser utilizada como terapêutica adicional na asma (Wu, Chen et al. 2016).

Relativamente às doenças alérgicas que resultam em distúrbios cutâneos destaca-se a dermatite atópica. Esta patologia, geralmente conhecida por eczema, caracteriza-se por uma inflamação crónica da pele como resultado da integridade da barreira cutânea comprometida entre outros fatores. A sua etiologia permanece por explicar, no entanto, a suscetibilidade genética e fatores ambientais antes e depois do nascimento podem estar envolvidos na sua patogénese (Rather, Bajpai et al. 2016).

A utilização dos probióticos no tratamento da dermatite atópica carece de mais estudos. No entanto, algumas investigações revelam resultados interessantes (Rather, Bajpai et al. 2016).

Num estudo duplo cego randomizado foi testado o efeito de uma combinação de probióticos constituída por *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus fermentum* em 220 crianças com dermatite atópica durante três meses. Conclui-se que a administração desta mistura é eficaz na redução da gravidade da doença e na melhoria da qualidade de vida e que os resultados persistem até quatro meses após descontinuar a toma (Wang and Wang 2015).

Num estudo mais recente foi testado o efeito da administração oral de uma mistura de *Bifidobacterium lactis* CECT 8145, *Bifidobacterium longum* CECT 7347 e *Lactobacillus casei* CECT 9104 em crianças com dermatite atópica durante 12 semanas. Outro objetivo era avaliar a influência desta mistura na utilização de corticosteroides tópicos na população estudada. Os resultados revelaram uma redução no índice de SCORAD e uma redução da aplicação tópica de corticosteroides nos pacientes tratados com a combinação de probióticos (Navarro-López, Ramírez-Boscá et al. 2018).

IV. Perspetivas Futuras

Os probióticos contam com uma ampla utilização desde há séculos tendo os principais géneros explorados o estatuto de Generally Regarded as Safe (GRAS). A evolução das técnicas de sequenciação genética e o conhecimento mais profundo da composição e funções do microbiota permitem o desenvolvimento de probióticos tendo em conta necessidades mais específicas e alvos mais concretos. Esta nova variedade de microrganismos com potencial benéfico é designada como probióticos da próxima geração (NGPs) (O'Toole, Marchesi et al. 2017).

Desta recente classe de probióticos fazem parte *Clostridium* clusters IV, XIVa e XVIII, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides fragilis* e *Eubacterium hallii* (El Hage, Hernandez-Sanabria et al. 2017).

F. prausnitzii é uma bactéria de Gram positivo, extremamente sensível ao oxigénio e de difícil cultura, pertencente ao filo *Firmicutes* e um dos membros mais abundantes do microbiota intestinal saudável (Martín, Miquel et al. 2017). Os principais produtos resultantes da fermentação da glicose por *F. prausnitzii* são SCFA como o D-lactato, ácido fórmico e butirato, sendo este último o responsável pela homeostasia e integridade intestinal (Chang, Lin et al. 2019). A produção de butirato por esta bactéria é particularmente importante. Este metabolito constitui a principal fonte de energia dos colonócitos e tem atividade na modulação da resposta imunitária. As suas propriedades anti-inflamatórias conferem proteção ao colón contra a inflamação e mesmo contra o cancro colorretal (Lopez-Siles, Duncan et al. 2017). Além da produção de metabolitos, *F. prausnitzii* produz uma proteína anti-inflamatória chamada “Anti-inflammatory Molecule” (MAM) que inibe a ativação do NF- κ B *in vitro* e *in vivo* e inibe as respostas imunitárias das células Th1 e Th17 na colite induzida quimicamente em ratos (Quévrain, Maubert et al. 2016) (Breyner, Michon et al. 2017).

A redução de *F. prausnitzii* no microbiota intestinal está associada a várias patologias intestinais como DC, CU e DII e, como tal, este microrganismo pode ter potencial como bioindicador do estado de saúde (Ferreira-Halder, Faria et al. 2017).

A. muciniphila é uma bactéria de Gram negativo, anaeróbia, que coloniza a camada mucosa do intestino humano e tem a capacidade de degradar a mucina. A capacidade de degradar a mucina e também a de produzir SCFA como o acetato são benéficos para outros membros do microbiota produtores de butirato e para o hospedeiro. Assim, promove a viabilidade dos colonócitos, melhorando a função de barreira intestinal (Hiippala, Jouhten et al. 2018). *A. muciniphila* desempenha um papel importante na prevenção e melhoria de doenças metabólicas e a sua abundância no microbiota intestinal apresenta correlação negativa com doenças como obesidade e diabetes (Dao, Everard et al. 2016) (Ottman, Geerlings et al. 2017).

O potencial benéfico desta espécie foi comprovado em estudos com ratinhos alimentados com dieta hipercalórica. Os resultados da administração de *A. muciniphila* revelaram melhoria nos seguintes parâmetros: ganho de massa gorda, endotoxemia metabólica, inflamação do tecido adiposo, resistência à insulina e barreira intestinal (Everard, Belzer et al. 2013) (Schneeberger, Everard et al. 2015). O desempenho dos probióticos pode ser melhorado recorrendo à bioengenharia. Através da manipulação dos genes de interesse é possível potenciar o efeito benéfico no hospedeiro. As aplicações da bioengenharia são diversas e os probióticos recombinantes podem conduzir a melhoria na tolerância ao stress associada às condições do TGI; melhoria na adesão ao TGI; produção de peptídeos antimicrobianos; melhoria da resposta imunitária; administração de vacinas e medicamentos e tratamento e prevenção de cancro (Sola-Oladokun, Culligan et al. 2017). Uma técnica utilizada é o sistema CRISPR-Cas, que é uma ferramenta de edição do genoma que promete resultados promissores no que diz respeito ao desenvolvimento de linhagens probióticas para uma abordagem mais direcionada para a prevenção, tratamento ou terapêutica coadjuvante em determinadas doenças (Douillard and de Vos 2019).

Por outro lado, a bioengenharia permite também a exclusão de genes que não têm interesse como genes de resistência a antibióticos ou genes de virulência (Douillard and de Vos 2019).

V. Conclusão

O microbiota intestinal, conjunto de microrganismos que habitam o TGI, assume um papel extremamente importante na saúde e na doença humanas. As funções que desempenha são fundamentais para o desenvolvimento saudável do hospedeiro, nomeadamente a influência na resposta imunitária. Outras funções como a influência na neurofisiologia do hospedeiro têm gerado um crescente interesse e sido alvo de estudos.

A manutenção da homeostasia do microbiota pode ser comprometida devido a inúmeros fatores, como por exemplo, alterações na dieta, exposição a antibióticos ou toxinas, quadros de inflamação ou infeção. Nos últimos anos, o aumento da incidência de doenças multifatoriais como obesidade, diabetes mellitus, doença inflamatória intestinal, doenças neurodegenerativas, asma e alergias tem sido associado a distúrbios na composição do microbiota intestinal.

A intervenção terapêutica com o objetivo de corrigir estes desequilíbrios passa pela modulação da composição do microbiota. Os probióticos são uma ferramenta amplamente utilizada para a reposição e manutenção do equilíbrio do microbiota como consequência dos seus efeitos benéficos.

Os mecanismos gerais através dos quais exercem os seus efeitos benéficos são conhecidos e resultam da modulação do sistema imunitário, da interação com o microbiota intestinal, do reforço da barreira epitelial intestinal e da sua influência noutros órgãos do organismo.

Relativamente às patologias gastrointestinais, já existe considerável evidência dos efeitos benéficos dos probióticos. Os resultados promissores que se têm verificado em patologias menos exploradas como obesidade, alergias ou doenças neurológicas têm de ser bem interpretados e requerem estudos mais aprofundados, especialmente com humanos. Mais estudos clínicos controlados têm de ser realizados para avaliar os efeitos dos probióticos e para otimizar a dose a administrar e o período de tratamento. A existência de heterogeneidade nos resultados é uma limitação para a implementação destas terapêuticas na prática clínica.

A evolução tecnológica originou o reconhecimento de novas estirpes com potencial benéfico, os probióticos de próxima geração, e a melhoria de propriedades benéficas em

estirpes já existentes e muito utilizadas. A eficácia dos NPGs depende da compreensão das alterações do microbiota, da etiologia da doença e do modo de ação específico de cada estirpe. A sua utilização baseada em evidência científica devidamente suportada é muito útil para a prevenção e tratamento de doenças bem como para coadjuvante terapêutico.

VI. Referências

Abenavoli, L., et al. (2019). Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients*, 11, 2690.

Abraham, B. P. and E. M. M. Quigley (2017). Probiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 46(4),769-782.

Adak, A. and M. R. Khan (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci*, 76(3), 473-493.

Akkasheh, G., et al. (2016). Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, 32(3), 315-320.

Alam, A. and A. Neish (2018). Role of gut microbiota in intestinal wound healing and barrier function. *Tissue barriers*, 6(3), 1539595-1539595.

Allen, A. P., et al. (2016). Bifidobacterium longum 1714 as a translational psychobiotic: modulation of stress, electrophysiology and neurocognition in healthy volunteers. *Translational Psychiatry*, 6(11), e939-e939.

Athari Nik Azm, S., et al. (2018). Lactobacilli and bifidobacteria ameliorate memory and learning deficits and oxidative stress in β -amyloid (1-42) injected rats. *Appl Physiol Nutr Metab*, 43(7), 718-726.

Bäckhed, F., et al. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*, 17(5), 690-703.

Bermúdez-Humarán, L. G., et al. (2019). From Probiotics to Psychobiotics: Live Beneficial Bacteria Which Act on the Brain-Gut Axis. *Nutrients*, 11(4), 890.

Bianchi, F., et al. (2019). Gut microbiome approaches to treat obesity in humans. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(3), 1081-1094.

Blaabjerg, S., et al. (2017). Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Outpatients—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics*, 6(4), 21.

Breyner, N. M., et al. (2017). Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from Faecalibacterium prausnitzii Shows a Protective Effect on DNBS and DSS-Induced

Colitis Model in Mice through Inhibition of NF- κ B Pathway. *Frontiers in microbiology*, 8, 114.

Bron, P. A., et al. (2017). Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *The British journal of nutrition*, 117(1), 93-107.

Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect*, 44(1),1-8.

Cerdó, T., et al. (2019). The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients*, 11(3), 635.

Chang, C. J., et al. (2019). Next generation probiotics in disease amelioration. *J Food Drug Anal*, 27(3), 615-622.

Chen, Y. S., et al. (2010). Randomized placebo-controlled trial of lactobacillus on asthmatic children with allergic rhinitis. *Pediatr Pulmonol*, 45(11), 1111-1120.

Dahiya, D. K., et al. (2017). Gut Microbiota Modulation and Its Relationship with Obesity Using Prebiotic Fibers and Probiotics: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 8, 563.

Dale, H. F., et al. (2019). Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients*, 11(9), 2048.

Dao, M. C., et al. (2016). Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, 65(3), 426-436.

de Melo Pereira, G. V., et al. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060-2076.

DeGruttola, A. K., et al. (2016). Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis*, 22(5), 1137-1150.

Delgado, S., et al. (2020). Molecules Produced by Probiotics and Intestinal Microorganisms with Immunomodulatory Activity. *Nutrients*, 12(2), 391.

Derwa, Y., et al. (2017). Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 46(4), 389-400.

Di Cicco, M., et al. (2018). Does lung microbiome play a causal or casual role in asthma? *Pediatr Pulmonol*, 53(10), 1340-1345.

Dinan, T. G., et al. (2013). Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry*, 74(10), 720-726.

Donaldson, G. P., et al. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbio*, 14(1), 20-32.

Douillard, F. P. and W. M. de Vos (2019). Biotechnology of health-promoting bacteria. *Biotechnol Adv*, 37(6), 107369.

El Hage, R., et al. (2017). Emerging Trends in “Smart Probiotics”: Functional Consideration for the Development of Novel Health and Industrial Applications. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1889.

Eslami, M., et al. (2019). Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol*, 234(10), 17127-17143.

Everard, A., et al. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(22), 9066-9071.

Ferreira-Halder, C. V., et al. (2017). Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 31(6), 643-648.

Flynn, K. J., et al. (2018). Spatial Variation of the Native Colon Microbiota in Healthy Adults. *Cancer Prevention Research*, 11(7), 393-402.

Fontana, L., et al. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr*, 109 Suppl 2, S35-50.

Ford, A. C., et al. (2018). Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, 48(10), 1044-1060.

Ford, A. C., et al. (2017). Irritable Bowel Syndrome. *N Engl J Med*, 376(26), 2566-2578.

Foster, J. A. and K. A. McVey Neufeld (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci*, 36(5), 305-312.

Fuller, R. (1986). Probiotics. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 15, 1s-7s.

Fung, T. C., et al. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*, 20(2), 145-155.

- Gérard, P. (2016). Gut microbiota and obesity. *Cell Mol Life Sci*, 73(1), 147-162.
- Hiippala, K., et al. (2018). The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients*, 10(8), 988.
- Hollister, E. B., et al. (2014). Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*, 146(6), 1449-1458.
- Hume, M. E. (2011). Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poult Sci*, 90(11), 2663-2669.
- Jha, A. R., et al. (2018). Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya. *PLoS Biol*, 16(11), e2005396.
- Każmierczak-Siedlecka, K., et al. (2020). Therapeutic methods of gut microbiota modification in colorectal cancer management – fecal microbiota transplantation, prebiotics, probiotics, and synbiotics. *Gut Microbes*, 11(6), 1518–1530.
- Kioui, D. E., et al. (2019). Probiotics in Extraintestinal Diseases: Current Trends and New Directions. *Nutrients*, 11(4),788.
- Kolodziejczyk, A. A., et al. (2019). Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nature Reviews Microbiology*, 17(12), 742-753.
- Kriss, M., et al. (2018). Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. *Curr Opin Microbiol*, 44, 34-40.
- Lacy, B. E., et al. (2016). Bowel Disorders. *Gastroenterology*, 150(6), 1393-1407.
- Lau, C. S. and R. S. Chamberlain (2016). Probiotics are effective at preventing *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *International journal of general medicine*, 9, 27-37.
- Levy, M., et al. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*, 17(4), 219-232.
- Li, B., et al. (2020). Efficacy and Safety of Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in pharmacology*, 11, 332-332.

Li, D., et al. (2016). The gut microbiota: A treasure for human health. *Biotechnology Advances*, 34(7): 1210-1224.

Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965). Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, 147(3659): 747-748.

Lloyd-Price, J., et al. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Med*, 8(1), 51.

Lopez-Siles, M., et al. (2017). Faecalibacterium prausnitzii: from microbiology to diagnostics and prognostics. *The ISME journal*, 11(4), 841-852.

Mardini, H. E. and A. Y. Grigorian (2014). Probiotic mix VSL#3 is effective adjunctive therapy for mild to moderately active ulcerative colitis: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*, 20(9), 1562-1567.

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

Martín, R., et al. (2017). Functional Characterization of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of F. prausnitzii as a Next-Generation Probiotic. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1226-1226.

Messaoudi, M., et al. (2010). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition*, 105(5), 755-764.

Messaoudi, M., et al. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*, 2(4), 256-261.

Milani, C., et al. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*, 81(4), e00036-17.

Misra, S. and D. Mohanty (2019). Psychobiotics: A new approach for treating mental illness? *Crit Rev Food Sci Nutr*, 59(8), 1230-1236.

Molska, M. and J. Reguła (2019). Potential Mechanisms of Probiotics Action in the Prevention and Treatment of Colorectal Cancer. *Nutrients*, 11(10), 2453.

Murphy, E. A., et al. (2015). Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 18(5), 515-520.

Navarro-López, V., et al. (2018). Effect of Oral Administration of a Mixture of Probiotic Strains on SCORAD Index and Use of Topical Steroids in Young Patients With Moderate Atopic Dermatitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*, 154(1), 37-43.

Nicholson, J. K., et al. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262-1267.

Nishida, A., et al. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 11(1), 1-10.

O'Mahony, L., et al. (2005). Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, 128(3), 541-551.

O'Toole, P. W., et al. (2017). Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol*, 2, 17057.

Ottman, N., et al. (2017). Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 31(6), 637-642.

Papadimitriou, K., et al. (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology*, 6, 58-58.

Pascal, M., et al. (2018). Microbiome and Allergic Diseases. *Frontiers in immunology*, 9, 1584-1584.

Patel, R. and H. L. DuPont (2015). New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin Infect Dis*, 60 Suppl 2, S108-121.

Petersen, C. and J. L. Round (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular microbiology*, 16(7), 1024-1033.

Peterson, C. T., et al. (2015). Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *Clin Exp Immunol*, 179(3), 363-377.

Pickard, J. M., et al. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*, 279(1), 70-89.

Pinto-Sanchez, M. I., et al. (2017). Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 153(2), 448-459.e8.

Portune, K. J., et al. (2016). Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 213-232.

Quévrain, E., et al. (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*, 65(3), 415-425.

Rather, I. A., et al. (2016). Probiotics and Atopic Dermatitis: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 7, 507.

Rivière, A., et al. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology*, 7, 979.

Rosenbaum, M., et al. (2015). The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol Metab*, 26(9), 493-501.

Sáez-Lara, M. J., et al. (2016). Effects of Probiotics and Synbiotics on Obesity, Insulin Resistance Syndrome, Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Human Clinical Trials. *Int J Mol Sci*, 17(6), 928.

Salazar, N., et al. (2017). Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut Microbes*, 8(2), 82-97.

Sánchez, B., et al. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res*, 61(1), 1600240.

Sanders, M. E., et al. (2018). Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr Opin Biotechnol*, 49, 207-216.

Sanders, M. E., et al. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605-616.

Schneeberger, M., et al. (2015). *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports*, 5(1), 16643.

Sharma, G. and S. H. Im (2018). Probiotics as a Potential Immunomodulating Pharmabiotics in Allergic Diseases: Current Status and Future Prospects. *Allergy Asthma Immunol Res*, 10(6), 575-590.

Shen, J., et al. (2014). Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis*, 20(1), 21-35.

Sola-Oladokun, B., et al. (2017). Engineered Probiotics: Applications and Biological Containment. *Annu Rev Food Sci Technol*, 8, 353-370.

Sornplang, P. and S. Piyadeatsoontorn (2016). Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of animal science and technology*, 58, 26.

Stecher, B., et al. (2013). 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol*, 11(4), 277-284.

Szajewska, H., et al. (2016). Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(3), 495-506.

Takiishi, T., et al. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*, 5(4), e1373208.

Tamtaji, O. R., et al. (2019). Clinical and metabolic response to probiotic administration in people with Parkinson's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr*, 38(3), 1031-1035.

Tap, J., et al. (2017). Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 152(1), 111-123.e118.

Thursby, E. and N. Juge (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*, 474(11), 1823-1836.

Torres, J., et al. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, 389(10080), 1741-1755.

Tropini, C., et al. (2017). The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. *Cell Host Microbe*, 21(4), 433-442.

Turroni, F., et al. (2014). *Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal. *Front Microbiol*, 5, 437.

Turróni, F., et al. (2019). Bifidobacterium bifidum: A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. *Microorganisms*, 7(11), 544.

Ursell, L. K., et al. (2012). Defining the human microbiome. *Nutr Rev*, 70 Suppl 1, S38-44.

Wang, B., et al. (2017). The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*, 3(1), 71-82.

Wang, I. J. and J. Y. Wang (2015). Children with atopic dermatitis show clinical improvement after Lactobacillus exposure. *Clin Exp Allergy*, 45(4), 779-787.

Westfall, S., et al. (2017). Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cell Mol Life Sci*, 74(20), 3769-3787.

Wilkins, T. and J. Sequoia (2017). Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am Fam Physician*, 96(3), 170-178.

Wu, C. T., et al. (2016). Effects of immunomodulatory supplementation with Lactobacillus rhamnosus on airway inflammation in a mouse asthma model. *J Microbiol Immunol Infect*, 49(5), 625-635.

Yano, J. M., et al. (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, 161(2), 264-276.

Young, V. B. (2017). The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *Bmj*, 356, j831.

Zeng, M. Y., et al. (2017). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol*, 10(1), 18-26.