

Andreia Ribeiro

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2021

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

Andreia Ribeiro

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2021

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

Andreia Ribeiro

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

Orientadora:

Professora Doutora Amélia Assunção

Sumário

O trato gastrointestinal de um indivíduo saudável está colonizado por uma grande variedade e quantidade de microrganismos que compõem o microbiota intestinal, o qual desempenha um importante papel nos processos metabólicos, nutricionais, fisiológicos e imunológicos. Em situações de disbiose, resultante de desequilíbrios na composição ou função das espécies constituintes do microbiota, ocorrem alterações da função imunológica o que aumenta a suscetibilidade de desenvolver alergias, alterações metabólicas, doenças inflamatórias e doenças neurodegenerativas.

Os probióticos são suplementos alimentares contendo microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades razoáveis, serão benéficos à saúde do seu consumidor ou hospedeiro. A sua administração exógena permite colonizar e estabilizar a composição da microflora, restabelecendo a sua função fisiológica vital, após desequilíbrios provocados pelo estilo de vida moderno e pelas várias doenças a ele associadas. Os metabólitos produzidos por microrganismos probióticos através de diferentes mecanismos de ação, desempenham um importante papel na modulação imunológica e na manutenção da homeostase do microbiota.

O Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro foi recentemente identificado com a descoberta de diversas vias hormonais e bioquímicas interligadas que relacionam o trato gastrointestinal e o cérebro. Este eixo desempenha um papel importante na regulação da saúde do hospedeiro, permitindo a comunicação bidirecional entre intestino e cérebro, o que sugere que o uso de probióticos poderá ter um forte potencial terapêutico no tratamento de doenças do sistema nervoso central como a Esclerose Múltipla, a Doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer.

Palavras-chave:

Microbiota, Probióticos, Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro, Esclerose Múltipla, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer.

Abstract

The gastrointestinal tract of a healthy individual is colonized by a wide variety and quantity of microorganisms that make up the intestinal microbiota, playing an important role in metabolic, nutritional, physiological and immunological processes. In situations of dysbiosis, resulting from imbalances in the composition or function of the species that make up the microbiota, immune function may be compromised, increasing the susceptibility of developing allergies, metabolic changes, inflammatory diseases and neurodegenerative diseases.

Probiotics are food supplements containing live microorganisms that, when administered in reasonable amounts, will be beneficial to the health of their consumer or host. Its exogenous administration allows colonization and stabilization of the microflora composition, restoring its vital physiological function, after imbalance due to modern lifestyle and associated diseases. Probiotic metabolites, through diverse mechanisms of action, play an important role in immunological modulation and maintenance of microbiota homeostasis.

The Microbiota-Gut-Brain Axis was recently identified with the discovery of several interconnected hormonal and biochemical pathways linking the gastrointestinal tract and the brain. This Axis plays an important role in the regulation of host health by allowing bidirectional communication between the intestine and the brain, thus suggesting probiotic use as a promising therapeutic strategy for the treatment of central nervous system diseases such as multiple sclerosis, Parkinson's disease and Alzheimer's disease.

Key words:

Microbiota, Probiotics, Microbiota-Intestine-Brain Axis, Multiple Sclerosis, Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Amélia Assunção, orientadora da minha tese, pelo seu apoio, pela sua dedicação e disponibilidade durante a sua realização.

Agradeço aos meus pais por me acompanharem e apoiarem em todos os momentos da minha vida e pelo apoio e grande ajuda na concretização deste projeto pessoal.

Agradeço ao Luís por todo o apoio e grande ajuda na concretização deste projeto.

Agradeço ao meu marido, Ricardo, por todo o apoio, incentivo, paciência e amizade e às minhas filhas, Clara e Sara, pela paciência e apoio.

A todos um MUITO OBRIGADA!!

Índice

<i>Sumário</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
<i>Agradecimentos</i>	<i>iii</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>vi</i>
<i>I. Introdução</i>	<i>8</i>
<i>II. Desenvolvimento</i>	<i>11</i>
<i>1-Microbiota</i>	<i>11</i>
<i>2. Probióticos</i>	<i>14</i>
2.1 Breve Perspetiva Histórica.....	14
2.2. Definição.....	15
2.3. Mecanismos de Ação	16
2.3.1. SCFAs	17
2.3.2. Ligandos de AHR.....	18
2.3.3. Poliaminas	20
2.3.4. Inosina	22
2.3.5. Histamina.....	23
2.3.6. Sinais QS	24
2.4. <i>Prevenção e Tratamento de Doenças</i>	26
2.5. <i>Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro</i>	28

<i>2.6. Doenças do Sistema Nervoso Central e Impacto do Tratamento com Probióticos</i>	34
.....	
2.6.1. Esclerose Múltipla	34
2.6.2. Doença de Parkinson.....	38
2.6.3. Doença de Alzheimer.....	42
<i>III. Conclusão e Perspetivas Futuras.....</i>	<i>47</i>
<i>IV. Bibliografia.....</i>	<i>48</i>

Abreviaturas

AHLs – Lactonas acil-homoserina

ARH – Recetores de Hidrocarbonetos de Arilo

A_{2a}R- Recetor de Adenosina 2a

BDNF- Fator Neurotrófico Cerebral

CSF- *Competence and Sporulation Factor*

CXCL-1- Ligando da Quimiocina 1

DA – Doença de Alzheimer

DP – Doença de Parkinson

EAE – Ratinhos com Encefalomielite Autoimune Experimental

EECs – Células Enterocromafins Intestinais

EIC – Eixo Intestino Cérebro

EM – Esclerose Múltipla

EMIC – Eixo Microbiota Intestino Cérebro

GF – Ratinhos *Germ-free*

HAQs – 4-hydroxy-2-alkilquinolinas

HDC – Enzima Histidina Descarboxilase

HPA – Eixo Hipotálamo Hipófise

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

H₁₋₄R – Recetor de Histamina 1-4

HSPs – *Heat Shock Proteins*

IECs – Células Epiteliais Intestinais

IL-1,4,6,10,13,17 - Interleucinas 1, 4, 6, 10, 13, 17

IFN- β - Interferon- β

INF- γ - Interferon- γ

NF- κ B – *Nuclear Factor - γ B*

QS – *Quorum Sensing*

SCFAs – Ácidos Gosrdos de Cadeia Curta

SNA – Sistema Nervoso Autónomo

SNC – Sistema Nervos Central

SNE – Sistema Nervoso Entérico

SPF – *Specific Pathogen-Free*

Células Th – Células T *helper*

TLR – Recetor *Toll Like*

TNBS Trinitrobenzoato

TNF- α - *Tumour Necrose FActor*

Células Treg – Células T reguladoras

TCR – Recetor de Antígeno Transgénico

I. Introdução

Microbiota, é o nome atribuído ao conjunto diversificado de microrganismos que estabelecem colônias permanentes, geralmente associados a tecidos ou órgãos, no interior ou à superfície do organismo sem causar doença, e que desempenham um importante papel em processos metabólicos, nutricionais, fisiológicos e imunológicos (Lin e Zhang, 2017; Otmann *et al.*, 2012; Rooks e Garret, 2016). Trabalhos científicos realizados para estudar a composição do microbiota em adultos saudáveis demonstraram que a maioria dos microrganismos pertenciam aos filos Bacteroidetes e Firmicutes verificando-se uma variação inter e intra-individual relativamente à sua composição ao longo da vida de cada indivíduo devido a vários fatores como o tipo de parto, a dieta nos primeiros 2-3 anos de vida (leite materno ou fórmula) e, nas fases seguintes, a doença, a toma de antibióticos, a obesidade (Flint *et al.*, 2015; Otmann *et al.*, 2012). O trato gastrointestinal de um indivíduo saudável está colonizado por uma grande variedade e quantidade de microrganismos constituindo a microbiota intestinal. A composição do microbiota intestinal e os produtos por si produzidos e libertados desempenham um papel fundamental no metabolismo e no desenvolvimento e função do sistema imunitário do hospedeiro, sendo importante manter uma composição do microbiota que promova a saúde, podendo probióticos desempenhar um importante papel nesta manutenção (Lin e Zhang, 2017; Flint *et al.*, 2015; Rooks e Garret, 2016) .

Probiótico significa “para a vida” (*pro* do latim significa “para” e *bio* do grego significa “vida”), daí se definir probióticos como sendo suplementos alimentares contendo microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades razoáveis, serão benéficos à saúde do seu consumidor ou hospedeiro (Sharif-Rad *et al.*, 2020; Wilkins e Sequoia, 2017). Estão presentes naturalmente em alguns alimentos que sofreram fermentação como queijos e iogurtes. As propriedades saudáveis dos laticínios levaram a um estudo mais sistemático dos mesmos, surgindo assim o conceito de probióticos. O termo foi criado por Werner Kollath em 1953, no entanto Elie Metchnikov, em 1905, foi pioneiro nos estudos que levaram à descoberta do possível efeito de microrganismos na saúde humana (Gasbarrini *et al.*, 2016). Os probióticos são usados para repor o equilíbrio microbiano afetado por possíveis patologias, pela toma de antibióticos, pela dieta e certos

estilos de vida, sendo também frequentemente usados como preventivos, evitando o desequilíbrio nocivo das populações microbianas. Os mecanismos de ação dos probióticos são diversos, incluindo a produção de substâncias antimicrobianas como os ácidos orgânicos e bacteriocinas, a regulação da resposta imunitária, a redução do risco de desenvolvimento de alergias, a melhoria da função da mucosa intestinal como barreira, a promoção da estabilidade ou recuperação da microflora comensal e a diminuição da adesão de agentes patogênicos à mucosa (Wilkins e Sequoia, 2017).

Em vários estudos descritos na literatura foi confirmado o papel protetor dos probióticos em doenças gastrointestinais, tais como na diarreia infecciosa aguda de origem bacteriana e na diarreia associada à toma de antibióticos, demonstrando-se a sua eficácia no tratamento e/ou prevenção destas situações. O uso de probióticos também demonstrou a sua eficácia relativamente a doenças do foro psiquiátrico, como depressão leve a moderada, reduzindo os sintomas depressivos dos pacientes, tais como os transtornos no humor e no sono (Sharif-Rad *et al.*, 2020).

O Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro (EMIC) desempenha um papel importante na regulação da saúde do hospedeiro através da comunicação bidirecional entre intestino e cérebro. As interações deste eixo têm sido bastante estudadas uma vez que se supõe que distúrbios no microbiota possam provocar um desequilíbrio no eixo e conseqüentemente promover o aparecimento de várias patologias do sistema nervoso central (SNC) como doença de Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla. Estudos realizados recorrendo ao modelo animal apoiam que variações no microbiota possam levar a alterações no metabolismo e na barreira intestinal, promovendo a formação de moléculas que desencadeiam a neuroinflamação, a lesão neuronal e conseqüente degeneração influenciando assim as funções do cérebro (Caputi e Giron, 2018; Giau *et al.*, 2018; Mayer *et al.*, 2015; Quigley, 2017).

Com a realização desta revisão bibliográfica procura-se primeiramente abordar o microbiota, nomeadamente as suas características, composição e funções. Em segundo lugar, explicar o que são probióticos e como atuam no microbiota, prevenindo, tratando ou atenuando algumas patologias. Em terceiro lugar, pretende-se abordar as inter-relações do EMIC e possíveis conseqüências da falta de regulação deste eixo, que conduzem ao

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

desenvolvimento de doenças do SNC, tais como a esclerose múltipla (EM), a doença de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA). Discutir-se-ão também recentes abordagens terapêuticas baseadas em probióticos, com impacto no microbiota do doente.

O presente estudo representa uma revisão dos conhecimentos sobre o tema proposto. Nesse sentido, foi realizada uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos, redigidos em inglês, em bases de dados científicas digitais, designadamente Pubmed, utilizando os termos “microbiota”, “probiotics”, “probiotics AND history”, “probiotics AND mechanism of action”, “probiotics AND clinical utility”, “probiotics AND neurodegenerative diseases”, “probiotics AND Multiple Sclerosis”, “probiotics AND Alzheimer”, “probiotics AND Parkinson Disease” reportada ao período compreendido entre 2002 e 2021. Após a leitura do resumo dos artigos selecionados, foram escolhidos os mais relevantes e atuais para alcançar os objetivos propostos.

II. Desenvolvimento

1-Microbiota

O trato gastrointestinal de um indivíduo saudável está colonizado por uma grande variedade e quantidade de microrganismos, constituindo a flora intestinal. Microbiota é o nome atribuído ao conjunto diversificado de microrganismos que estabelecem colônias permanentes, geralmente associadas a tecidos ou órgãos, no interior ou à superfície do organismo, sem causar doença e que desempenham um importante papel atuando em processos metabólicos, nutricionais, fisiológicos e imunológicos (Lin e Zhang, 2017; Otmann *et al.*, 2012; Rooks e Garret, 2016). O microbiota intestinal, sendo o mais numeroso e diverso, desempenha um papel fundamental nestes processos.

O microbiota intestinal é essencial para o desenvolvimento e modulação do sistema imunitário do hospedeiro e para o seu funcionamento, desempenhando papel importante na manutenção da homeostase intestinal. Desequilíbrios na composição ou função das espécies constituintes do microbiota, designada por disbiose, conduzem a alterações na função imunológica e na suscetibilidade de desenvolver doenças inflamatórias, tais como a doença de Crohn, a colite ulcerosa e a artrite reumatóide, alergias e alterações metabólicas (Lin e Zhang, 2017).

Trabalhos científicos realizados para estudar a composição do microbiota intestinal em adultos saudáveis recorrendo a amostras de tecidos do cólon e de fezes verificaram que a maioria dos microrganismos pertenciam aos filos Bacteroidetes e Firmicutes e em menor quantidade aos filos bacterianos Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia (Hold *et al.*, 2002; Eckburg *et al.*, 2005). Os Bacteroidetes possuem enzimas do tipo hidrolases, que são responsáveis pela hidrólise de polissacarídeos e nos Firmicutes estão incluídas espécies que degradam polissacarídeos não degradáveis pelo trato gastrointestinal e espécies que são responsáveis pela degradação do lactato a propionato e butirato, prevenindo assim a acidificação do meio (que pode ocorrer por acumulação de ácido no intestino) e estabilizando o seu microbiota. Vários são os fatores que interferem no estabelecimento do microbiota e na variação da sua composição ao longo da vida de cada

indivíduo. Estes fatores incluem a dieta nos primeiros 2-3 anos de vida (leite materno, fórmula) e nas fases seguintes, o desenvolvimento de doença, a toma de antibióticos, a obesidade e, possivelmente, apenas a idade (Flint *et al.*, 2015; Otmann *et al.*, 2012).

O processo de formação do microbiota é um processo dinâmico que se inicia aquando do nascimento, estabilizando após os 2-3 primeiros anos de vida. A composição bacteriana do mesmo está relacionada com a suscetibilidade de desenvolver doença durante toda a vida. O tipo de parto de cada indivíduo é responsável pelo microbiota estabelecido logo no nascimento. O parto normal expõe o bebé ao ambiente materno, entrando em contato com as bactérias vaginais e fecais, originando um microbiota dito natural. A cesariana estabelece um microbiota mais rico em bactérias existentes na pele da mãe, pobre em bifidobactérias (filo Actinobacteria). Até atingir a idade adulta a composição microbiana vai atingir uma complexidade elevada, tanto em riqueza como em diversidade, podendo observar-se várias centenas de espécies. No indivíduo adulto, saudável, a composição do microbiota intestinal é razoavelmente estável atingindo o clímax homeostático. No entanto, alterações podem ser observadas como consequência da composição da dieta, como ocorrência de doenças e também aquando da toma de medicação como antibióticos. A composição poderá manter-se estável durante a maior parte da vida saudável do adulto. Os idosos com mais de 100 anos, no entanto, possuem um microbiota característico devido a alterações fisiológicas próprias do envelhecimento, com as modificações do estilo de vida, comportamento nutricional, o aumento da suscetibilidade para desenvolver infeções e doenças inflamatórias. Verificam-se nestes indivíduos uma diminuição nas bactérias pertencentes ao filo Firmicutes e um aumento das pertencentes ao filo Actinobactérias (Lin e Zhang, 2017; Flint *et al.*, 2015; Otmann *et al.*, 2012).

Estudos realizados recorrendo a voluntários humanos, permitiram compreender os mecanismos responsáveis pela variação do microbiota intestinal (Salonen *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2011). A dieta tem influência na composição, observando-se competição relativamente ao uso de substratos provenientes da alimentação sendo favorecidas as espécies para as quais estejam disponíveis substratos em maior quantidade, princípio usado pelos prébióticos na manipulação do microbiota. A composição também depende da tolerância das diferentes espécies a uma série de fatores presentes no trato intestinal tais como, variação de pH, concentração elevada de sais biliares ou baixa concentração

de micronutrientes, aos quais os microrganismos estão expostos e os quais podem limitar o crescimento microbiano (Flint *et al.*, 2015).

Estudos sugerem que os metabolitos produzidos pelos microrganismos que compõem o microbiota saudável são importantes para o metabolismo e maturação do sistema imunitário do hospedeiro. destes metabolitos destacam-se ácidos gordos de cadeia curta (SCFAs – *short chain fatty acids*), como o butirato, o acetato e o propionato, as poliaminas, ligandos de recetores de hidrocarbonetos arilo (ARH – *aryl hydrocarbons*), sinais *Quorum Sensing* (QS), e componentes do próprio microbiota, como o polissacarídeo A (PSA), os péptidos formil (Lin e Zhang, 2017; Flint *et al.*, 2015; Rooks e Garret, 2016).

Os principais produtos microbianos da fermentação de hidratos de carbono são os SCFAs, os quais funcionam como de fonte energia para os colonócitos do hospedeiro e exercem também efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos, efeitos que se pensa serem preventivos no desenvolvimento do cancro colo-rectal. Os metabolitos produzidos pela comunidade microbiana presente no microbiota estão fortemente relacionados com o tipo de dieta, variando com as quantidades ingeridas de hidratos de carbono, proteínas e gorduras (Sleeth *et al.*, 2010).

Dadas as evidências científicas deverá ser realizado um estudo mais aprofundado da influência dos metabolitos microbianos na imunidade de modo a facilitar a descoberta de novas terapias para o tratamento de patologias associadas à disbiose intestinal, tais como as doenças inflamatórias, autoimunes e oncológicas.

2. Probióticos

2.1 Breve Perspetiva Histórica

A história dos probióticos é muito antiga e está relacionada com o uso de alimentos fermentados. Há 10000 anos atrás a agricultura substituiu a caça e a coleta, surgindo depois a domesticação animal no período neolítico da idade da pedra. No médio oriente os habitantes consumiam leite fermentado desde 10000 AC, havendo também registo do seu consumo no Egipto, Grécia e Itália. Cerca de 8000 AC, os nómadas Tibetanos, que viviam a altitudes superiores a 4000m, apesar da escassez e mesmo ausência de fruta e vegetais na sua dieta, eram saudáveis devido ao consumo de leite fermentado de iaque e dos seus derivados, ricos em lactobacilos. Textos ayurvédicos indianos ancestrais relacionam o consumo de leite e lacticínios a uma vida longa e saudável. Arqueólogos encontraram evidências de produção de bebidas fermentadas, relativas a 7000 AC (numa vila neolítica na China) e a 5000 AC (na Mesopotâmia). Também foram encontradas evidências relativas aos anos 3000-2000 AC do uso de produtos fermentados do leite por hindus, gregos e romanos. Plínio na sua história Natural recomenda o uso de leite fermentado para tratar infeções gastrointestinais. Hipócrates, no século IV, introduziu o termo “comida funcional” escrevendo o seguinte: “que a comida seja o teu medicamento e o medicamento seja a tua comida” (Gasbarrini *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018).

As propriedades saudáveis dos lacticínios contribuíram para um estudo mais sistemático de leite fermentado e de iogurte contendo bactérias. Elie Metchnikoff em 1905, após ter observado que os camponeses búlgaros tinham uma longa esperança de vida, concluiu que tal se devia ao facto de consumirem grandes quantidades de iogurte fermentado durante a sua vida. O estudo permitiu demonstrar que bacilos presentes no iogurte eram idênticos a bacilos encontrados nas fezes, os quais foram mais tarde designados por *Lactobacillus bulgaricus*. Metchnikoff considerou os lactobacilos como tendo influência positiva na saúde prevenindo o envelhecimento. Na mesma época, um outro investigador, Henry Tissler, isolou *Bifidobacterium* de fezes de crianças uma bactéria com capacidade de impedir o crescimento de bactérias patogénicas *in vitro*. Tissler verificou que crianças

saudáveis estavam colonizadas por *Bifidobacterium* enquanto que crianças menos saudáveis não apresentavam a bactéria (Gasbarrani *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018).

Durante a segunda guerra mundial, soldados alemães observaram, em África, que Beduínos usavam fezes frescas de camelo no tratamento da disenteria. Estudos permitiram identificar o elemento ativo presente nas fezes, como sendo a bactéria *Bacillus subtilis* (Gasbarrani *et al.*, 2016).

Em 1953, Werner Kollath, introduziu o termo “probiótico”, descrevendo-o como sendo “substância ativa essencial para uma vida saudável”. Nos anos 50 foram realizados muitos trabalhos de investigação no sentido de identificar probióticos que conferissem resistência à colonização por patogénios. Os primeiros trabalhos focaram-se no tratamento de diarreia usando lactobacilos e bifidobacilos, o que permitiu verificar o papel dos probióticos na manutenção de um intestino saudável prevenindo e tratando infeções que desencadeiam diarreias. Em 1992, Fuller, definiu probióticos como sendo “suplementos alimentares contendo microrganismos vivos os quais afetam benéficamente os hospedeiro animal, melhorando o equilíbrio do microbiota intestinal” (Gasbarrani *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018).

Nos nossos dias, a investigação biomédica sobre as interações da flora intestinal com o seu hospedeiro, bem como sobre a sua regulação, tem uma grande importância devido ao seu potencial promotor da saúde.

2.2. Definição

Probiótico significa “para a vida” (*pro* do latim significa “para” e *bio* do grego significa “vida”), daí se definir probióticos como sendo suplementos alimentares contendo microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades razoáveis, serão benéficos à saúde do seu consumidor ou hospedeiro (Wilkins *et al.*, 2017). Estão presentes naturalmente em alguns alimentos que sofreram fermentação como queijos e iogurtes, os quais, como mencionado anteriormente, estão associados a ações benéficas na vida de quem os consome. A ingestão deste tipo de alimentos é um dos sistemas

preferenciais para administração de probióticos, relativamente aos suplementos, devido à elevada importância dada hoje em dia à alimentação saudável e nutrição. No entanto, após elaboração de legislação que assegura a sua segurança e eficácia, os probióticos podem ser também administrados em produtos dietéticos, suplementos alimentares e medicamentos. O estilo de vida moderno e as várias doenças a ele associadas podem desencadear um desequilíbrio na flora intestinal sendo importante a administração exógena de probióticos para colonizar e estabilizar a composição da microflora restabelecendo a função fisiológica vital da flora comensal (Gasbarrani *et al.*, 2016; Stavropoulou e Bezirtzoglou, 2020; Wilkins *et al.*, 2017).

2.3. Mecanismos de Ação

Como referido acima, os probióticos desempenham um papel importante na manutenção do equilíbrio imunitário interagindo diretamente com células imunitárias no trato gastrointestinal.

O microbiota luminal, a barreira de muco, a lâmina própria rica em células e os seus elementos vasculares e neurológicos são os principais locais de ação dos probióticos no intestino. Também foi descrito que os probióticos podem controlar a motilidade intestinal exercendo a sua ação no músculo liso e, também podem desencadear respostas imunológicas atuando nos linfonodos mesentéricos (Liu *et al.*, 2018). Os mecanismos de ação dos probióticos são diversos. Entre outros, podemos mencionar: (i) a produção de substâncias antimicrobianas como os ácidos orgânicos e as bacteriocinas que promovem a produção de mucinas intestinais prevenindo a adesão de patogénicos; (ii) a regulação da motilidade intestinal; (iii) a regulação da resposta imunitária (reduzindo o risco de desenvolver alergias); (iv) a melhoria da função de barreira da mucosa intestinal, mantendo a sua integridade através da ação citoprotetora; (v) a promoção da estabilidade ou recuperação da microflora comensal quando afetada; (vi) a modulação da expressão de genes do hospedeiro; (vii) a libertação de proteínas funcionais ou enzimas naturais (Dimidi *et al.*, 2017; Plaza-Dias, 2019; Rao e Samak, 2013).

Metabolitos produzidos por organismos probióticos com um reconhecido papel na modulação imunológica e manutenção da homeostase do microbiota (SCFAs, ligandos de AHR, poliaminas, sinais QS, inosina e histamina) são de grande importância na promoção da saúde do hospedeiro (Lin e Zhang, 2017; Liu *et al.*, 2018; Rooks e Garret, 2016). Assim, os seus mecanismos de ação serão desenvolvidos seguidamente.

2.3.1. SCFAs

O butirato, o acetato e o propionato, todos SCFAs, são produzidos no cólon por bactérias comensais, tais como *Facecalibacterium prausnitizii*, *Eubacterium rectale* e também por vários outros organismos como lactobacilos e bifidobactérias (Lin e Zhang, 2017).

Os lactobacilos produzem SCFAs através da fermentação de hidratos de carbono, formando lactato que por sua vez é metabolizado a butirato. As bifidobactérias também produzem SCFAs por fermentação de hidratos de carbono, originando acetato e formato, se a quantidade de hidratos de carbono disponíveis no intestino for limitada ou acetato e lactato se os hidratos de carbono estão em excesso (Lin e Zhang, 2017; Liu *et al.*, 2018; Rooks e Garret, 2016).

O microbiota intestinal pode ser manipulado pela dieta e pela ingestão de hidratos de carbono, que se podem designar prebióticos uma vez que promovem o crescimento seletivo bacteriano e estimulam a sua atividade metabólica. Quando combinados com probióticos obtêm-se produtos simbióticos o que permite alterar a composição bacteriana no sentido de estimular a produção dos SCFAs pretendidos. A seleção apropriada de estirpes de probióticos é a base para o futuro desenvolvimento de suplementos e produtos alimentares assim como para o planeamento de estudos futuros (Lin e Zhang, 2017).

Como exemplo do que foi referido anteriormente, da capacidade dos probióticos lactobacilos produzirem SCFAs, pode-se apresentar o estudo realizado por Sivieri *et al* o qual sugere que os *Lactobacillus acidophilus* promovem a saúde em humanos sendo benéficos para o metabolismo microbiano e para a composição da comunidade de lactobacilos presente no intestino (Sivieri *et al.*, 2013). Sivieri e colegas recorreram ao

reator SHIME (Simulador do Ecossistema Microbiano Humano) com o objetivo de observar qual o efeito dos lactobacilos na fermentação padrão realizada pelo microbiota intestinal e verificaram que a administração de *L. acidophilus* tem influência na composição da comunidade microbiana intestinal induzindo um aumento significativo de lactobacilos e bifidobactérias. Foram observados efeitos benéficos dos *L. acidophilus* relativamente ao metabolismo bacteriano como o aumento da produção de SFCAs como o acetato, propionato e butirato, no decorrer do estudo (Sivieri *et al.*, 2013).

Os SCFAs são benéficos para preservar o intestino saudável mantendo a homeostase metabólica nos colonócitos, protegendo-os das agressões externas, estimulando a produção de muco pelas células globosas presentes no epitélio intestinal, fortalecendo a integridade e a função de barreira das IECs (Células Epiteliais Intestinais) inibindo a entrada de toxinas do lúmen intestinal para a circulação sistêmica, participando na manutenção da resposta imunológica tanto local como sistêmica, diminuindo a síntese de colesterol e promovendo a contração muscular controlando a motilidade intestinal. O propionato parece estar relacionado com a diminuição da síntese de colesterol e consequente diminuição do risco de desenvolver doença cardiovascular. O butirato é a principal fonte de energia das células epiteliais do cólon e tem a capacidade de controlar a inflamação intestinal induzindo a diferenciação das células T reguladoras (Treg), que executam um papel importante na regulação do sistema imunitário, e assim são importantes para prevenir o desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes, podendo também conferir proteção contra o desenvolvimento de cancro cólon-rectal (Lin e Zhang, 2017; Liu *et al.*, 2018; Rooks e Garret, 2016; Sivieri *et al.*, 2013).

2.3.2. Ligandos de AHR

O metabolismo dos alimentos ingeridos pode resultar na produção de ligandos dos AHR. Os AHR são expressos por células imunológicas, por células epiteliais e por algumas células tumorais, estando relacionados com o metabolismo de xenobióticos e com a regulação da resposta imunológica da mucosa. A sinalização via AHR leva à transcrição de diferentes genes em células dendríticas e em células T sendo responsáveis pela

manutenção da tolerância imunológica do intestino e na função de barreira. (Rooks e Garret, 2016).

Li *et al* (2011) realizaram um estudo recorrendo ao modelo animal, o ratinho. Compararam um grupo de ratinhos que não expressa AHR com outro grupo que o expressa, com o objetivo de estudar o papel do recetor na manutenção da homeostasia e da saúde e de compreender quais os efeitos observados quando este recetor é sub-expresso. Verificaram que o recetor é importante para a manutenção do número de linfócitos intraepiteliais especializados no intestino. Verificaram que a ausência ou deficiência de ligandos AHR promove a ativação da resposta imunológica e aumenta o risco de dano epitelial. Este dano parece estar relacionado com alterações nos linfócitos intra-epiteliais especializados e na composição do microbiota intestinal. Os resultados obtidos por este grupo sugeriram que a atividade dos AHR pode ser regulada pela dieta e pela composição do microbiota intestinal (Li *et al.*, 2011).

Alguns microrganismos que compõem o microbiota intestinal, particularmente os *Lactobacillus* spp, podem metabolizar o triptofano proveniente da alimentação produzindo metabolitos como os derivados do ácido indólico. Estes metabolitos do triptofano podem ligar-se aos AHR nas células hospedeiras, desempenhando um importante papel no equilíbrio entre tolerância e ativação imunológica. Se ocorrer deficiência em AHR ou falta dos seus ligandos poderão ocorrer alterações na composição da microbiota intestinal levando a inflamação do cólon (Liu *et al.*, 2018; Rooks e Garret, 2016) .

Zelante *et al* (2013) realizaram um trabalho experimental também em ratinhos, com o objetivo de estudar a influência dos metabolitos do triptofano na reatividade da mucosa. Zelante e a sua equipa verificaram que ocorria expansão da população de bactérias lactobacilos após administração de triptofano em condições em que a sua disponibilidade era limitada promovendo a produção de ligandos AHR. Verificaram que a bactéria *Lactobacillus reuteri* (que atua como probiótico) na presença de triptofano no lúmen intestinal produz índole-3-aldeído (IAId). Este metabolito ativou células linfóides inatas 3 (ILC3), induzindo a produção de IL-22 (Interleucina-22), a qual conferiu resistência à

Candida albicans, aumentando a proteção da mucosa contra inflamação (Zelante *et al.*, 2013).

Os estudos abordados sugerem que o tratamento com probióticos capazes de metabolizar o triptofano poderá constituir uma terapêutica estratégica para alterar a composição da microbiota, aumentando a produção de ligandos AHR, promovendo assim a proteção do hospedeiro da inflamação intestinal.

2.3.3. Poliaminas

A putrescina, a espermidina e a espermina são poliaminas que se encontram na maioria das células vivas. Estas poliaminas desempenham funções biológicas importantes envolvidas no crescimento, proliferação e morte celular, através da regulação de vários genes envolvidos na divisão celular epitelial. Níveis baixos de poliaminas inibem o crescimento celular anormal, inibindo o crescimento da mucosa e atrasam o processo de cicatrização, enquanto que níveis altos exercem efeito tóxico e carcinogénico. Desse modo, a concentração intracelular tem que ser regulada pelo hospedeiro quer através da biossíntese e do catabolismo, quer através de mecanismos de assimilação e de efluxo, assim como através da síntese e da degradação de enzimas biossintéticas. Os elementos importantes para a síntese de poliaminas são a enzima arginase 1, a qual converte arginina em ornitina, a enzima ornitina descarboxilase, a qual sintetiza putrescina a partir da ornitina, e as enzimas sequenciais que catalisam a inter-conversão da putrescina, espermidina e espermina (Rooks e Garret, 2016).

Estudos sugerem que a síntese de poliaminas é uma função importante do microbiota intestinal adquirida nos primeiros anos de vida. O intestino contém níveis elevados de poliaminas derivadas da dieta e da produção pelo próprio hospedeiro e pelas bactérias aí presentes. Estudos realizados demonstram que as poliaminas desempenham um importante papel na manutenção da integridade da barreira epitelial no intestino. O estudo realizado por Chen *et al* (2007) pretendeu estudar o papel das poliaminas na regulação da expressão dos recetores TLR (Toll – like receptors) e conseqüentemente na modulação da função de barreira do epitélio intestinal (Chen *et al.*, 2007). Os TLR estão presentes

nas IECs e desempenham um papel importante uma vez que permitem ao epitélio detetar microrganismos nocivos promovendo a ativação da imunidade inata após infeção. Os resultados obtidos por Chen e colaboradores sugerem que a expressão dos TLR2 está dependente das poliaminas, que funcionam como reguladores biológicos desempenhando um importante papel na regulação da função de barreira epitelial intestinal, na manutenção da sua integridade e homeostase da mucosa sob condições fisiológicas (Chen *et al.*, (2007).

Outros estudos como o realizado por Liu *et al* (2009) também apoiam a ideia de que as IECs necessitam das poliaminas para a sua proliferação e manutenção da função de barreira através da estimulação da produção de proteínas da junção intercelular da mucosa intestinal, como a caderina E, a qual promove a adesão forte entre as células regulando a permeabilidade da barreira epitelial (Liu *et al.*, 2009). Liu e a sua equipa realizaram também um estudo *in vitro*, recorrendo à cultura de tecidos, com o objetivo de perceber o efeito das poliaminas na indução da expressão da caderina E e consequente papel deste fator na manutenção da integridade da barreira epitelial. Verificaram que as poliaminas controlam a função de barreira epitelial intestinal regulando a transcrição de caderina E através do fator c-Myc o qual promove a transcrição da proteína aumentando os seus níveis, com consequente manutenção de integridade da barreira. No caso em que se observou redução do c-Myc verificou-se a inibição da transcrição da caderina E e consequente disfunção da barreira epitelial o que apoia o papel positivo das poliaminas nesta situação (Liu *et al.*, 2009).

Vários estudos apoiam que as alterações no metabolismo das poliaminas afetam também a regulação da imunidade, podendo resultar em processos inflamatórios. Estes também podem estar associados com o desenvolvimento de doenças neurológicas e de tumores uma vez que podem promover a carcinogénese (Rooks e Garret, 2016).

O envelhecimento e as modificações nos processos celulares que o acompanham podem resultar em alterações dos níveis de poliaminas e consequente alteração da função imunológica originando inflamação crónica a qual parece estar associada com o desenvolvimento de doenças neuro-degenerativas (Minois *et al.*, 2011). Matsumoto *et al* (2011) realizaram um estudo recorrendo ao modelo animal com o objetivo de provar que o uso de probióticos poderá aumentar a longevidade suprimindo a inflamação crónica

através do aumento da produção de poliaminas no lúmen intestinal. Matsumoto e a sua equipa suplementaram a dieta dos ratinhos em estudo com a estirpe *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512, a qual estimula a síntese de poliaminas, tendo verificado um aumento da longevidade dos mesmos quando comparados com o grupo controlo, sem ingestão de probiótico. A longevidade observada pareceu estar associada com supressão do desenvolvimento da inflamação crónica induzida pelos níveis elevados de poliaminas. Estes resultados sugeriram que a ingestão de probióticos específicos poderá contribuir para melhorar a saúde intestinal e aumentar a esperança média de vida (Matsumoto *et al.*, 2011).

Alterações na síntese de poliaminas também foram associadas ao desenvolvimento de cancro, havendo evidências que apoiam a relação entre aumento da biossíntese de poliaminas, a carcinogénese e a imunidade tumoral. As células cancerígenas, células altamente proliferativas, requerem poliaminas para suprir as necessidades que permitam um crescimento rápido. Muitos pacientes com cancro têm os níveis de poliaminas aumentados tanto no sangue como na urina quando comparados com indivíduos saudáveis (Miller-Fleming *et al.*, 2015).

Evidências sugerem que, através da manipulação da dieta e do fornecimento de bactérias benéficas, poder-se-á alterar benéficamente o metabolismo das poliaminas em benefício da saúde do hospedeiro. A regulação da biossíntese de poliaminas poderá ser um alvo promissor na terapia contra o cancro e na quimioprevenção (Rooks e Garret, 2016).

Mais estudos de investigação deverão ser realizados, em humanos, para compreender melhor a influência do metabolismo das poliaminas na saúde e no desenvolvimento de doença do hospedeiro.

2.3.4. Inosina

A adenosina é uma purina que resulta da degradação de aminoácidos e que pode ser convertida em inosina, interagindo com o recetor A_{2a}R (Adenosine Receptor 2a) localizado nas células T *helper* (Th) inibindo a inflamação. As células Treg produzem adenosina a qual é importante para controlar a ação das células Th. Estudos realizados recorrendo a modelo animal de ratinhos “scurfy” permitiram identificar a capacidade das

bactérias *L. reuteri* para regular a inflamação multiorgânica (He *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017). Os ratinhos “scurfy” apresentam deficiência genética das Foxp3⁺ Treg, que modulam a ação das células T inflamatórias. A deficiência nas Foxp3⁺ Treg promove a disbiose do microbiota intestinal e a inflamação, ocorrendo nestes ratinhos reações de autoimunidade. Estas reações foram revertidas pela administração de *L. reuteri*, as quais atuaram ao nível do microbiota intestinal prolongando a sobrevivência dos animais e reduzindo a inflamação multiorgânica. Verificou-se que a administração de *L. reuteri* contribuiu para restaurar os níveis de inosina (metabolito produzido por estas bactérias), a qual contribui para prolongar o tempo de vida e inibir a inflamação multiorgânica, reduzindo a ativação de células Th1 e Th2 e suas citocinas associadas interagindo com o recetor A2R (He *et al.*, 2017).

2.3.5. Histamina

A histamina é uma amina biogénica que participa nas respostas imunológicas sendo um dos principais mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória anafilática e na resposta alérgica, também desempenhando a função de neurotransmissor. É sintetizada e armazenada nos mastócitos, sendo libertada após estimulação, como no caso da hipersensibilidade imediata, pela interação antígeno-anticorpo IgE (Imunoglobulina E) na superfície dos mastócitos. No entanto, a histamina pode também ser sintetizada por várias estirpes bacterianas (Frei *et al.*, 2013; Ganesh *et al.*, 2018).

A histamina exerce os seus efeitos imunoreguladores interagindo com o hospedeiro através dos seus 4 recetores: H₁R, H₂R, H₃R e H₄R (*Histamine 1-4 Receptor*) sendo os recetores H₁R e H₂R os mais abundantes no intestino. O recetor H₁R é conhecido por ser o responsável por iniciar as vias pro-inflamatórias aumentando a fosforilação da proteína cinase C e o H₂R por suprimir a inflamação induzindo a fosforilação da proteína cinase A ou suprimindo a inflamação mediada pelo TLR (Ganesh *et al.*, 2018).

Vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, foram realizados com o objetivo de perceber qual o papel da histamina no processo inflamatório. Thomas *et al* realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de identificar qual o metabolito produzido pelo *L. reuteri* com capacidade de inibir o TNF- α (Tumour Necrosis Factor α) tendo verificado que esta estirpe

bacteriana era capaz de converter a L-histidina em histamina a qual é responsável pela supressão do processo pro-inflamatório inibindo a produção de TNF- α através da ativação do recetor H₂R (Thomas *et al.*, 2012). Gao et al realizaram um estudo *in vivo* recorrendo ao modelo animal de colite induzida pelo trinitrobenzoato (TNBS). Demonstraram que a administração de uma estirpe específica de *L. reuteri*, que possui a enzima histidina descarboxilase (HDC) e, portanto, a capacidade de converter histidina em histamina, suprimia a inflamação intestinal e a expressão de citocinas da IL-6 (Interleucina-6) e IL-1 (Interleucina-1) no cólon (Gao *et al.*, 2015).

Os estudos realizados permitem concluir que a histamina produzida pela *L. reuteri* atua via recetor H₂R, presente nas células epiteliais e nos macrófagos, reduzindo os níveis de citoquinas pró-inflamatórias como o TNF- α e outras, contrariando a inflamação.

2.3.6. Sinais QS

A via QS refere-se à comunicação entre bactérias e à capacidade das bactérias de detetar e responder à densidade celular. É um mecanismo regulador da atividade metabólica e de atividades fisiológicas, dependente da densidade celular, e que é mediado através da produção de pequenos compostos moleculares, os sinais QS, moléculas autoindutoras que incluem as lactonas acil-homoserina (AHLs), as 4-hydroxy-2-alkilquinolinas (HAQs) e que apresentam algum potencial no desenvolvimento de novas terapias (Keller e Surette, 2006; Wu *et al.*, 2020).

Algumas bactérias patogénicas oportunistas, como por exemplo a *Pseudomonas aeruginosa* (de Gram negativo) recorrem à produção de QS para iniciar a expressão de fatores de virulência e formação de biofilme facilitando a invasão e colonização dos hospedeiros (Kim *et al.*, 2010). Os resultados obtidos no estudo realizado por Kim *et al* (2010) revelaram que os sinais QS produzidos pelas *P. aeruginosa* poderão contrariar a resposta imunitária, facilitando a difusão dos invasores e o estabelecimento da patogenicidade bacteriana permitindo que as bactérias promovam uma estratégia eficaz para a evasão imunológica bacteriana e sobrevivência no hospedeiro (Kim *et al.*, 2010).

As bactérias *B. subtilis* (de Gram positivo) também demonstraram exercer ações imunomoduladoras nos hospedeiros. Estas bactérias libertam sinais QS como o fator CSF (*Competence and Sporulation Factor*), o qual induz a produção de HSPs (*Heat Shock Proteins*) que promovem a proteção das IECs do stress oxidativo resultante de infecção, inflamação, exposição a toxinas, o que evita a perda de função de barreira (Fujiya *et al.*, 2007; Okamoto *et al.*, 2012). Okamoto *et al.* (2012) realizaram um estudo *in vitro* cultivando uma linha celular intestinal, a Caco2/bbc na presença ou ausência do fator CSF. Verificaram que o fator CSF tem um efeito anti-inflamatório mediado pela regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias IL-4 (Interleucina-4), IL-6 e CXCL-1 (Ligando de Quimiocina 1) e pela regulação positiva da IL-10 (Interleucina-10), citocina anti-inflamatória. Neste mesmo estudo Okamoto e colegas realizaram também experiências *in vivo* recorrendo ao modelo animal de colite induzida pela administração de DSS. Foi administrado CSF a alguns ratinhos verificando que estes apresentavam colite menos severa relativamente aos que não tinham sido administrados com esse fator. Os resultados obtidos permitem concluir que o CSF poderá representar uma estratégia terapêutica no tratamento ou prevenção da inflamação intestinal (Okamoto *et al.*, 2012).

2.4. Prevenção e Tratamento de Doenças

A manutenção de um microbiota intestinal saudável, é reconhecido como sendo importante na conservação da saúde, sendo o uso de probióticos cada vez mais considerado a possível prevenção e tratamento de diversas patologias. São vários os fatores que podem provocar alterações indesejadas no microbiota, tais como a dieta, o estilo de vida, a exposição a toxinas e o uso de certos fármacos como antibióticos, podendo conduzir ao desenvolvimento de doença (Manor *et al.*, 2020).

Os probióticos são atualmente já usados na prevenção e tratamento de algumas patologias, sendo reconhecidos os seus efeitos positivos no tratamento e na atenuação de sintomas em doenças gastrointestinais tais como a diarreia aguda causada por bactérias, a diarreia resultante da toma de antibióticos e a diarreia do viajante (Sharifi-Rad, 2020). Vários estudos de revisão e meta-análises apoiam o benefício do tratamento com probióticos. No entanto, mais investigação terá de ser desenvolvida nesta área, principalmente nos casos em que ainda há resultados controversos e inconclusivos, como por exemplo na síndrome do intestino irritável.

A metanálise desenvolvida por Islam (2016) inclui vários ensaios clínicos, abrangendo bebés, crianças e adultos, o que permitiu verificar que o uso de probióticos diminuiu significativamente a duração da diarreia aguda sendo mais eficaz em crianças do que em adultos (Islam, 2016).

A revisão sistemática realizada por Leung, apoia a eficácia do uso de probióticos, como *Saccharomyces boulardii* e *L. rhamnosus* GG, na prevenção da diarreia do viajante (Leung *et al.*, 2019). Outras revisões bibliográficas apoiam esta ideia (Islam, 2016).

Alguns estudos apoiam a eficácia dos probióticos na prevenção da diarreia, tanto em adultos como em crianças, provocada pela toma de antibióticos. A revisão bibliográfica e meta-análise desenvolvida por Hempel reuniu vários estudos abrangendo crianças e adultos, e apoia a ideia da eficácia dos probióticos nesta situação. Não é ainda claro quais as estirpes mais eficientes sendo necessário desenvolver mais estudos neste sentido (Hempel *et al.*, 2012).

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

Evidências sugerem que os probióticos têm efeito protetor ou atenuador no desenvolvimento de outras doenças para além das referidas acima, sendo necessários mais estudos nesse sentido (Kumar *et al.*, 2010). Como exemplo, podemos referir a possível ação protetora dos probióticos no desenvolvimento de câncros gastrointestinais como o cancro do cólon e o cancro gástrico (Javanmard *et al.*, 2018) através das suas propriedades anti-proliferativas e pró-apoptóticas (Liong, 2008; Rafter, 2004). Estudos nesta área foram realizados *in vitro*, recorrendo a cultura de células ou a modelo animal, tendo-se observado que o crescimento de algumas linhas celulares humanas de cancro do colon, como HT-21, SW 480 e a Caco-2 era inibido pelas bactérias *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 (Kim *et al.*, 2008). Verificou-se também o efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico das bactérias *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 e *L. rhamnosus* GG em células de cancro gástrico e em células de cancro do colon (Orlando *et al.*, 2012). Todos os resultados favorecem a ideia de proteção, pelos probióticos, contra o desenvolvimento de cancro gástrico. Mais estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos de ação, eficácia e segurança dos probióticos devendo, também, ser incluídos ensaios em humanos (Javanmard *et al.*, 2018).

Para além da sua ação na proteção contra o cancro e patologia intestinal, vários estudos apontam também para um papel importante dos probióticos em doenças neurológicas e do foro psiquiátrico, uma vez que alterações do microbiota podem promover a patogénese deste tipo de patologias (Umbrello e Esposito, 2016; Wang e Kasper, 2014; Wallace e Milev, 2017). Atualmente verifica-se um crescente interesse nesta área, e assim, de seguida irá ser abordada a aplicação de probióticos no tratamento de doenças neurológicas.

2.5. Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro

Desde há alguns anos que diversos investigadores sugeriram haver comunicação entre o intestino e o cérebro, baseando-se em várias observações. De facto, há cerca de 40 anos atrás Morgan *et al* (1982), observou melhoria clínica em doentes com encefalopatia hepática, após administração de antibióticos neomicina e metronidazole, os quais atuam sobre a flora intestinal reduzindo a produção endógena de amónia. Estes resultados sugeriram a existência de uma relação entre microbiota intestinal e cerebral de origem hepática.

Estas e outras evidências experimentais fizeram surgir o conceito EIC. Este eixo é definido como sendo um eixo neuroendócrino dinâmico em que são estabelecidas conexões entre o trato gastrointestinal, isto é, o sistema nervoso entérico (SNE), e o SNC e cuja a função é monitorizar e integrar as funções intestinais, bem como ligar os centros cognitivos do cérebro às funções e mecanismos intestinais periféricos. Estes processos envolvem mediadores neurológicos, como os neurónios do sistema nervoso simpático e parassimpático, mediadores endócrinos como as hormonas produzidas pelas células enterocromafins intestinais (EECs) e libertadas na circulação sanguínea (tais como a serotonina), e mediadores imunológicos, como as citocinas, permitindo a comunicação entre o meio externo e o cérebro (Carabotti, *et al.*, 2015; Quigley, 2017, Westfall *et al.*, 2017). Mais tarde, o EIC foi alargado de modo a incluir o microbiota intestinal, uma vez que surgiram evidências da sua influência no cérebro, passando a designar-se EMIC. Possíveis alterações que possam ocorrer no microbiota, podem afetar o funcionamento do eixo, originando sintomas gastrointestinais como a síndrome do intestino irritável, podendo também atuar no cérebro. A nível cerebral, as alterações do microbiota podem afetar o comportamento (ansiedade, depressão), a integridade da barreira hematoencefálica, a neurogénese e a produção de neurotransmissores, podendo haver relação com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla (Carabotti, *et al.*, 2015; Quigley, 2017).

A comunicação bidirecional no EMIC ainda não está claramente definida no entanto alguns autores como Carabotti e Mayer sugerem que ocorre com a participação de todos os seus componentes: o SNC, composto pelo cérebro e a medula espinal, o sistema

nervoso autónomo (SNA) simpático e parassimpático, o SNE, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o sistema límbico (envolvido no desenvolvimento da memória e nas respostas emocionais coordenando também a resposta adaptativa a qualquer tipo de situação de stress), e, também, o microbiota intestinal. A ação neuronal e hormonal combinam-se, atuando no cérebro e permitindo que este influencie a atividade das células efectoras funcionais intestinais, como as células do sistema imunitário, células epiteliais, neurónios entéricos, células musculares lisas e EECs (Carabotti *et al.*, 2015; Mayer *et al.*, 2015).

O microbiota intestinal pode interagir com o EIC através de diferentes vias. Pode atuar na proteção e restauração da integridade da barreira intestinal, modular a atividade dos nervos sensoriais aferentes e a ativação imunológica, podendo também atuar no controlo da motilidade intestinal e na perceção da dor, através da produção de neurotransmissores locais endócrinos e imunológicos como a serotonina, a melatonina, a acetilcolina e a histamina determinando alterações na motilidade e secreção intestinal causando hipersensibilidade visceral (Carabotti *et al.*, 2015).

Um dos exemplos mais concreto e bem caracterizado, que descreve as interações bidirecionais entre microrganismos, intestino e o SNC corresponde à via de sinalização das EECs via serotonina. As EECs do trato gastrointestinal, são reguladas pelos SCFAs produzidos pelo microbiota, os quais controlam a síntese e libertação de serotonina pelas EECs. A serotonina atua no SNC via nervos espinais e vagais (via aferente). A resposta cérebro-intestino ocorre via SNA (via eferente) e atua no microbiota e no intestino controlando a secreção e motilidade gastrointestinal (Martin *et al.*, 2018).

Com o objetivo de perceber a relação entre microbiota e o EIC foram realizados, nos últimos anos, vários estudos experimentais recorrendo ao modelo animal de ratinhos *germ free* (GF – criados em condições de esterilidade e apresentando assim um intestino estéril), à transplantação de microbiota intestinal e ao uso de antibióticos tendo os resultados obtidos sugerido haver comunicação entre o intestino e o cérebro (Carabotti *et al.*, 2015; Mayer *et al.*, 2015). Verificou-se que a ausência de colonização intestinal nos ratinhos GF está associada a deficiência da maturação do SNE e SNC, resultando em alteração das funções gástricas. Estas alterações traduzem-se em retardamento do esvaziamento gástrico e do trânsito intestinal, resultantes de alterações neuromusculares,

devido à redução da expressão genética de enzimas envolvidas na síntese e transporte de neurotransmissores e também de proteínas contráteis musculares. Após a colonização microbiana do intestino de forma específica para espécies bacterianas observou-se reversão desta situação (Caraboti *et al.*, 2015)

Outros estudos realizados em modelo animal de infecção em que foram administradas estirpes de probióticos ou antibióticos, mostraram que o microbiota intestinal desempenha um papel importante na modulação do estado cognitivo, da dor, ansiedade e depressão. Bravo e colaboradores (Bravo *et al.*, 2011) distribuíram trinta e seis ratinhos BALB/c adultos por quatro grupos: dois grupos controle sem administração de probióticos, um dos quais submetido a vagotomia (remoção do nervo vago), e dois grupos, aos quais foi administrada ração contendo 10^9 unidades formadoras de colônias (CFU) da estirpe probiótica *L. rhamnosus* (JB-1) durante vinte e oito dias, um dos quais também submetido a vagotomia. No dia do sacrifício e recolha de amostras metade dos indivíduos de cada grupo foram submetidos a situações de stress (hipertermia, condicionamento do medo, teste de natação forçada) com o objetivo de observar as diferenças de comportamento entre os grupos em estudo. No sacrifício foram colhidas amostras de sangue, para dosear corticosterona, e amostras de tecido cerebral para avaliar a expressão dos recetores GABA, um neurotransmissor que inibe o SNC. Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com probióticos induz alterações na expressão de recetores GABA no cérebro, sugerindo um papel modulador da administração de *L. rhamnosus* (JB-1) no sistema GABA dos ratinhos podendo ter efeitos benéficos no tratamento da depressão e ansiedade. Verificou-se, também, que estas bactérias reduzem a produção de corticosterona e consequentemente o stress, a ansiedade e a depressão induzidos pela mesma. A observação dos efeitos neuroquímicos e comportamentais nos ratinhos vagotomizados permitiu identificar o nervo vago como principal modulador na comunicação entre microbiota intestinal e cérebro reforçando o papel importante das bactérias na comunicação bidirecional do EIC e sugerindo que certos microrganismos podem ser usados como armas terapêuticas no tratamento de distúrbios relacionados com o stress com a ansiedade e a depressão (Bravo *et al.*, 2011).

Bercik e colaboradores (Bercik *et al.*, 2011) realizaram um estudo com objetivo de compreender de que modo alterações na composição do microbiota intestinal, resultantes

da disbiose, contribuem para o desenvolvimento de inflamação e distúrbios da função intestinal e para o desenvolvimento de doenças psiquiátricas. Para isso utilizaram ratinhos das estirpes BALB/c e NIH Swiss, ambas SPF (*specific pathogen-free*), ou seja, mantidos em condições tais que garantam estar livres de patógenos específicos (controlado por análise de rotina), e também ratinhos GF das mesmas estirpes. Alguns ratinhos foram submetidos a vagotomia ou simpatectomia química (remoção do nervo simpático principal). Foram administrados os antimicrobianos (não absorvíveis) neomicina, bacitracina e pimarcina, na água, durante 7 dias. Ratinhos das estirpes GF foram colonizados com microbiota intestinal proveniente dos ratinhos SPF. Foram realizadas análises da composição do microbiota presente em amostras do conteúdo do ceco dos diferentes ratinhos, bem como estudos comportamentais. No final da experiência foram também realizados estudos histológicos de amostras de intestino e de cólon para avaliar inflamação e a presença de citocinas e neurotransmissores, tendo sido também colhidos os cérebros para análise de fator neurotrófico cerebral (BDNF). A administração da mistura antimicrobiana provocou uma perturbação significativa na composição do microbiota intestinal dos ratinhos SPF, observando-se um incremento nas bactérias pertencentes aos filos Firmicutes (família Lactobacillaceae) e Actinobacteria e diminuição dos microrganismos pertencentes aos filos Proteobacteria e Bacteroides. Esta alteração foi associada com uma alteração no comportamento dos ratinhos, os quais se apresentaram mais exploratórios e menos apreensivos relativamente ao grupo controlo, tendo-se, também, verificado que estes efeitos eram reversíveis. A administração da mistura antimicrobiana a ratinhos GF não induziu alteração no comportamento. Contudo, essa administração já induziu alterações comportamentais nos GF inoculados com microbiota proveniente de ratinhos SPF o que reforça o papel do microbiota no comportamento. De modo a correlacionar as alterações no comportamento induzidas pela administração da mistura antimicrobiana com alterações bioquímicas no cérebro os níveis da proteína BDNF foram medidos tendo-se verificado que os ratinhos submetidos ao tratamento apresentavam níveis elevados deste fator.

A alteração do microbiota causada pela administração da mistura antimicrobiana não afetou o desenvolvimento de inflamação intestinal ou níveis de serotonina, dopamina ou noradrenalina o que sugere que alterações do SNE não são determinantes no

desenvolvimento de comportamento anormais nestes ratinhos. A vagotomia e a simpatectomia não interferiram na alteração do comportamento causado pelo tratamento com antibiótico, o que indica que tanto as vias parassimpática como simpática não estão envolvidas nas alterações comportamentais associadas à administração da mistura. Neste trabalho Bercik e colegas estudaram também, numa segunda fase, as diferenças de comportamento entre duas diferentes estirpes de ratinhos, BALB/c e GF NHI Swiss, sendo os primeiros mais tímidos e ansiosos do que os segundos. Os ratinhos GF NIH Swiss quando colonizados com microbiota proveniente de BALB/c apresentavam um comportamento menos exploratório do que os ratinhos colonizados com o microbiota de ratinhos NIH Swiss, contrastando com os ratinhos GF BALB/c colonizados com microbiota proveniente de NIH os quais apresentam comportamento mais exploratório do que os que foram colonizados com microbiota proveniente de BALB/c. Os comportamentos apresentados pelos ratinhos não apresentaram relação com os níveis de citocinas em circulação uma vez que os valores destes fatores apresentados pelas diferentes estirpes foram muito semelhantes.

Os resultados obtidos no trabalho desenvolvido por Bercik e a sua equipa apoiam fortemente o papel do EMIC na bioquímica cerebral e na modulação do comportamento em ratinhos adultos independentemente do SNA, dos neurotransmissores gastrointestinais específicos ou inflamação (Bercik *et al.*, 2011).

Evidências sugerem, também, que desequilíbrios no microbiota do hospedeiro poderão promover a neurodegeneração. Na lâmina própria do tecido subepitelial do trato gastrointestinal encontram-se células imunitárias inatas, como as células dendríticas e os macrófagos, que protegem o organismo de antigénios e que devido à sua localização se encontram próximas do microbiota intestinal. Situações que desencadeiem disbiose, podem permitir a invasão por patogénios e aumentar o número de antigénios que atravessam a barreira epitelial, podendo levar à ativação de cascatas de sinalização que resultam na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Poderá ser despoletada uma situação de neuroinflamação, o que promove o desenvolvimento da neurodegeneração (Faden e Loan, 2015; Smith *et al.*, 2011).

Alterações na via do metabolismo do triptofano que ocorrem em situação de disbiose podem resultar em alteração da função do sistema imunológico, desencadeando também

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

neuroinflamação, a qual parece estar relacionada com o desenvolvimento de doenças neurológicas como demência (Dinan e Cryan, 2017; Westfall *et al.*, 2016). Assim, estudos recentes sugerem que a disbiose microbiana contribui para o desenvolvimento de algumas doenças do foro psiquiátrico, como depressão, ansiedade e doenças neurodegenerativas como DP, DA e EM (Quigley, 2017; Westfall *et al.*, 2017).

2.6. Doenças do Sistema Nervoso Central e Impacto do Tratamento com Probióticos

O desenvolvimento de doenças neurodegenerativas está, entre outros fatores, associada à idade, ao envelhecimento. Como foi mencionado anteriormente, o envelhecimento afeta a diversidade do microbiota intestinal, podendo alterar o metabolismo do hospedeiro, tal como a via do metabolismo do triptofano.

A descoberta de diversas vias hormonais e bioquímicas interligadas que relacionam o trato gastrointestinal e o cérebro, sugerem que o uso de probióticos poderá ter um forte potencial terapêutico no tratamento de doenças do sistema nervoso central. De facto, o uso de probióticos poderá ser útil na prevenção e tratamento da neurodegeneração, através da forte ação anti-inflamatória apresentada pelo microbiota.

Como exemplos de doenças do SNC, vou-me debruçar sobre a EM, a DA e a DP.

2.6.1. Esclerose Múltipla

A EM é uma doença neurológica crónica, inflamatória e autoimune caracterizada pela desmielinização, isto é, pela destruição da bainha de mielina do tecido neuronal no SNC, ocorrendo também proliferação de astrócitos, e ativação da microglia. A desmielinização leva a degeneração dos axónios neuronais, promovendo a deterioração cognitiva e motora. Esta patologia afeta cerca de 2.5 milhões de pessoas no mundo (Morshedi *et al.*, 2019). Nesta patologia ocorre infiltração de linfócitos T auto-reativos no SNC, os quais segregam citocinas e quimiocinas que conduzem ao recrutamento de outras células do sistema imunológico. A inflamação que se estabelece leva à degeneração dos axónios cerebrais e neurónios em indivíduos com EM, através da ativação da microglia e macrófagos inflamatórios. A etiologia da doença ainda não é bem conhecida, sendo provavelmente multifatorial (Morshedi *et al.*, 2019).

Inúmeros estudos foram realizados recorrendo ao modelo animal de EM, isto é, ratinhos com encefalomielite autoimune experimental (EAE) (Berer *et al.*, 2011; Ochoa-Repáraz

et al., 2009), em que a EM é induzida por administração de antígenos pertencentes a proteínas que compõem a bainha de mielina do SNC. Alguns dos resultados obtidos revelaram que a alteração de certas populações bacterianas que constituem o microbiota intestinal podem contribuir para o estabelecimento de inflamação que, por sua vez, pode conduzir ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como a esclerose múltipla. Os estudos de Ochoa-Repáraz *et al* (2009) realizados em ratinhos com EAE induzida pela administração subcutânea de proteína proteolípídica em ratinhos SJL/J ou de glicoproteína oligodendrocita de mielina em ratinhos C57BL/6 mostraram que alterações na composição do microbiota intestinal interferem no desenvolvimento da patologia. Ochoa-Repáraz *et al* (2009) demonstraram que a administração de antibióticos via oral reduziu o microbiota intestinal, o que permitiu controlar a progressão da EAE através da indução de tolerância imunológica parecendo a proteção estar relacionada com a redução de citocinas pro-inflamatórias e com o aumento de IL-10 e IL-13 (Interleucina-13), com ação anti-inflamatória (Ochoa-Repáraz *et al.*, 2009). Berer *et al* (2011) utilizou um modelo de EAE espontânea, usando ratinhos transgênicos SJL/J que expressam, na maioria das suas células TCD4+, um receptor de antígeno (TCR) transgênico reconhecendo o péptido MOG 92-106 (um antígeno da bainha de mielina). Verificou que, neste modelo, o microbiota desempenha um papel essencial e que em ratinhos da mesma estirpe mas criados em condições GF era possível prevenir o desenvolvimento de EAE, atenuando as respostas Th17 e o desenvolvimento de células B auto-reativas (Berer *et al.*, 2011). Noutros estudos realizados em ratinhos foi realizada intervenção direta no microbiota, efetuando a colonização do intestino por *Bacteroides fragilis*, pertencentes ao Filo Bacteroidetes (Ochoa-Repáraz *et al.*, 2010). Esta alteração protegeu os ratinhos relativamente à desmielinização do SNC e conseqüentemente ao desenvolvimento de EAE. Por outro lado, a colonização do intestino de ratinhos GF por bactérias segmentadas e filamentosas induziu a produção de células Th17, as quais levaram à exacerbação da EAE (Lee *et al.*, 2011). Rothhammer *et al* (2016) observaram que as bactérias comensais do intestino suprimiam a inflamação e a neurodegeneração através da produção de ligandos derivados do triptofano que atuando no cérebro, modularam a função dos astrócitos. Um estudo realizado em 2017 por Mangalam *et al* demonstrou que a colonização por *Prevotella histicola* proveniente do intestino humano suprimia a EAE induzida em ratinhos transgênicos HLA-DR3.DQ8 não apresentando genes de MHC de

classe II, mais suscetíveis de desenvolver a doença, apresentando patologia do SNC. (Mangalam *et al.*, 2017).

Embora ainda pouco frequentes, estudos clínicos realizados, em doentes com EM sugeriram a presença de alterações no microbiota intestinal (Chen *et al.*, 2016; Jangi *et al.*, 2016). Chen *et al* (2016) desenvolveram um estudo com o objetivo de verificar se o microbiota intestinal está alterado nos doentes com EM através da comparação da composição do microbiota presente em amostras fecais de doentes com EM com amostras de indivíduos saudáveis, constituindo o grupo controlo. Chen e colegas observaram um incremento das bactérias pertencentes aos géneros *Pseudomonas*, *Mycoplasma*, *Haemophilus*, *Blautia*, e *Dorea* nos pacientes com EM, enquanto que o grupo controlo apresentava um aumento das bactérias pertencentes aos géneros *Parabacteroides*, *Adlercreutzia* e *Prevotella*. Os resultados obtidos apoiam a hipótese de que os doentes com EM apresentam disbiose do microbiota intestinal, embora mais estudos sejam necessários para perceber melhor o seu papel na origem e desenvolvimento da doença (Chen *et al.*, 2016). No estudo realizado por Jangi *et al* (2016) também realizado em doentes com EM, verificou-se que os géneros *Prevotella* e *Lactobacillus* estavam diminuídos em pacientes com EM quando comparados com os controlos saudáveis sugerindo serem importantes na prevenção da doença e no tratamento (Jangi *et al.*, 2016). Jangi *et al* (2016) observou que pacientes com EM apresentavam alterações no microbiota incluindo um aumento de *Methanobrevibacter* e uma diminuição na proporção de *Butyricimonas*, que poderiam estar relacionadas com variações na expressão de genes envolvidos na maturação das células dendríticas e nas vias de sinalização do interferão-beta (IFN- β) e do NF-kB (*Nuclear Factor-kB*) e consequente ativação de células T circulantes e de monócitos, promovendo a neuroinflamação.

Miyake *et al* (2015) verificou a presença de uma disbiose moderada no microbiota intestinal de pacientes com EM tendo, também, detetado uma mudança significativa na abundância de várias taxa, incluindo espécies pertencentes ao género *Clostridia*, que são conhecidos por apresentarem ação anti-inflamatória (Miyake *et al.*, 2015). Assim como no modelo animal, estudos recentes em humanos, realizados por Cosorich *et al*, demonstraram que a disbiose observada em pacientes com EM pode resultar numa

elevada frequência de células Th17 no intestino, correlacionando com um aumento da atividade da EM (Cosorich *et al.*, 2017).

A análise da informação apresentada acima, sugere que algumas bactérias comensais e os seus produtos antigênicos possam proteger contra a inflamação no SNC. Assim, os probióticos podem ser considerados como possíveis armas terapêuticas na manipulação do microbiota intestinal, o qual pode ser um alvo crucial para a prevenção, gestão e controle da EM. Poderão desenvolver-se tratamentos que permitam controlar a resposta inflamatória e modular as reações imunológicas prevenindo ou atrasando o desenvolvimento da doença.

Diversos estudos (tanto em modelo animal como em humanos) foram realizados com o objetivo de determinar as potencialidades benéficas dos probióticos, tanto na prevenção como no tratamento de várias doenças como a EM.

He *et al.* (2018), recorrendo ao modelo animal EAE, verificou que as bactérias *L. reuteri* DSM 17938 melhoraram a gravidade clínica apresentada pelos ratinhos, através da recuperação da diversidade do microbiota intestinal e consequente modulação da resposta imunológica observando-se uma redução dos níveis de células Th1 e Th17 e das citocinas por eles produzidas INF- γ (interferão- γ) e IL-17 (Interleucina-17) no soro e no intestino.

Morshedi e colegas realizaram uma revisão sistemática que incluiu informação de sete estudos, cinco realizados no modelo animal EAE e dois em doentes de EM, com o objetivo de verificar quais os efeitos da administração de probióticos na patologia. Foram observadas melhorias estatisticamente significativas em ambas as situações (Morshedi *et al.*, 2019). No primeiro estudo analisado verificaram que, após a administração oral, a doentes de EM, de uma cápsula contendo as espécies probióticos *L. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus fermentum* (administração de 2×10^9 CFU de cada espécie), verificou-se a diminuição na concentração da proteína C reativa (pCr) um controlo da função das células B autoreativas, diminuindo possíveis reações autoimunes, após 12 semanas de tratamento. A duração do segundo estudo com doentes de EM foi de 16 semanas e foram administradas cápsulas contendo as espécies probióticas *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *L. reuteri*, *L. casei*,

Lactobacillus plantarum e *L. fermentum* (administração de 2×10^9 CFU de cada espécie) tendo verificado diminuição da concentração de alguns marcadores inflamatórios como IL-6 e pCr e aumento da concentração de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Na avaliação dos estudos realizados em ratinhos Morshedi e colegas concluíram que o uso de probióticos pode ter um impacto positivo nos marcadores inflamatórios imunológicos, reduzindo a gravidade e progressão da doença, e também retardar o seu início. Num dos estudos verificaram os efeitos benéficos da administração de *L. plantarum* e *Bifidobacterium animalis* separadamente e em simultâneo, que contribuíram para o controlo da resposta inflamatória. Num outro estudo analisado verificaram os efeitos benéficos, tanto na prevenção como no tratamento, da administração de uma mistura de 5 espécies bacterianas, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *B. bifidum*, *Streptococcus thermophiles*, contendo 10^8 CFU/g de cada espécie (Morshedi *et al.*, 2019).

Tankou *et al.* (2018) realizaram um estudo clínico com humanos, que incluía 13 controlos e 9 doentes com EM, aos quais foi administrada oralmente uma saqueta, duas vezes por dia durante três meses, contendo uma mistura de probióticos contendo quatro espécies de *Lactobacillus* (*L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *Lactobacillus delbruckei*), e três espécies de *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium longum*, *B. infantis* e *Bifidobacterium breve*) e uma espécie de *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*). Foram analisadas amostras de sangue e fezes no início da experiência, após os dois meses de tratamento e três meses após o final da terapia. Tankou e os colegas concluíram que os probióticos tinham efeitos benéficos, inibindo a resposta inflamatória e diminuindo a expressão do alelo de risco HLA-DQA1 responsável pelo desenvolvimento da EM nos indivíduos pertencentes aos grupo de controlo, devido ao aumento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Tankou *et al.*, 2018).

2.6.2. Doença de Parkinson

DP é a segunda doença neurodegenerativa progressiva mais comum depois da doença de Alzheimer e afeta, principalmente, a coordenação motora. Caracteriza-se pela morte precoce de neurónios dopaminérgicos que se localizam na substância nigra, afetando a

produção de dopamina, e pela distribuição disseminada de proteína intracelular α -sinucleína, formando novos, constituindo os corpos de Lewy. Os quatro principais sintomas desta doença são o tremor, em repouso, da cabeça, de um membro ou do corpo inteiro, a rigidez muscular, a instabilidade postural e a deficiência motora. No entanto, outros sintomas são observados como disfunção no olfato, dor, e disfunção gastrointestinal (Radbakrishanan e Goyal, 2018; Gazerani, 2019).

Estudos recentes apoiam a possível participação do trato gastrointestinal, do SNE, do microbiota intestinal e do EIC no desenvolvimento da DP. Como tinha sido mencionado acima, a disfunção gastrointestinal é um dos sintomas não motores mais comuns, o que apoia a ideia da participação do microbiota intestinal no desenvolvimento desta doença (Gazerani, 2019).

Sabe-se, como já foi referido, que o envelhecimento está relacionado com a diminuição da diversidade microbiana intestinal e consequente acréscimo do número de bactérias patogénicas, podendo levar ao desenvolvimento de resposta inflamatória. Esta resposta pode contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Na revisão bibliográfica realizada por Westfall *et al.* (2017) foram analisados vários estudos que sugerem a presença de variações importantes na composição do microbiota em indivíduos idosos que sofrem de doenças neurodegenerativas (Westfall *et al.*, 2017). Os estudos analisados por Westfall e colegas apoiam que doentes com DP apresentam disbiose intestinal acentuada, tendo verificado, por exemplo, num dos estudos, que estes doentes apresentavam um aumento do biomarcador urinário de disbiose, o metabolito bacteriano sulfato de indoxil (também denominado indican), um metabolito do triptofano. Noutros estudos verificaram que em DP ocorreu alteração na composição da flora intestinal, com a diminuição do número de bactérias pertencentes à família Prevotellaceae, as quais são importantes na proteção contra a entrada de patógenos invasores pela barreira epitelial, tendo também verificado um aumento de bactérias da família Enterobacteriaceae, as quais parecem estar relacionadas com o desenvolvimento da instabilidade postural (Westfall *et al.*, 2017).

Sampson *et al.* (2016) realizaram estudos recorrendo ao modelo animal de ratinhos GF que apresentam sobre-expressão de α -sinucleína com o objetivo de perceber qual a ligação funcional entre o microbiota e o desenvolvimento de DP. Após realização da

experiência e análise dos resultados obtidos Sampson e colegas verificaram que o microbiota intestinal é importante para o desenvolvimento da patologia, sendo responsável pela manifestação dos sintomas físicos e pela promoção da neuroinflamação, através da ativação da microglia em regiões do cérebro afetadas na DP, provocando a exacerbação da doença. Neste trabalho também foi realizado o transplante do microbiota presente em amostras de fezes de indivíduos com DP em ratinhos GF com sobre-expressão de α -sinucleína, observando-se o agravamento das alterações físicas quando comparado como resultado obtido após transplantes do microbiota presente em fezes de indivíduos saudáveis. Estes resultados revelam que as bactérias intestinais regulam distúrbios motores no modelo animal, sugerindo que as alterações no microbiota humano representam um fator de risco para o desenvolvimento de DP (Sampson, 2016).

Shen *et al.* (2021) publicaram uma meta-análise que incluiu 15 estudos caso-controlo, com o objetivo de avaliar as diferenças entre o microbiota intestinal de DP e o microbiota de controlos saudáveis em diferentes regiões geográficas, como Itália, Finlândia e USA, entre outras. Nos pacientes com DP verificaram uma diminuição significativa nas bactérias pertencentes aos géneros *Prevotella*, *Faecalibacterium*, e *Lachnospiraceae* e um aumento significativo das bactérias pertencentes às famílias Bifidobacteriaceae, Ruminococcaceae, Verrucomicrobiaceae e Christensenellaceae quando comparado com o microbiota do grupo saudável, sendo os resultados semelhantes nas diferentes regiões estudadas. Shen e os colaboradores sugeriram que as alterações no microbiota intestinal desencadeado pela disbiose podem contribuir para o desenvolvimento da DP através da alteração na produção dos SCFAs, de alterações no metabolismo lipídico, na regulação da resposta imunológica e na permeabilidade intestinal (Shen *et al.*, 2021).

Apesar de mais investigação ser necessária nesta área, todos os estudos citados sugerem que as alterações observadas no microbiota intestinal resultantes da disbiose intestinal representam um fator de risco no desenvolvimento da DP. Neste sentido o possível uso de probióticos como arma terapêutica tem suscitado muito interesse.

Dado ainda não existir uma orientação terapêutica para o tratamento de sintomas não motores, como os sintomas gastrointestinais, apresentados pelos doentes com DP Georgescu *et al* (2016) decidiram realizar um estudo com o objetivo de testar o efeito do uso de probióticos nestes casos. O estudo clínico envolveu 40 pacientes com DP

medicados com levodopa ou dopamina. Estes pacientes apresentavam diversos sintomas não motores tais como dor abdominal, inchaço abdominal e obstipação leve a moderada. Georgescu e colaboradores distribuíram os 40 doentes por dois grupos, cada um com 20 indivíduos, tendo administrado a um grupo Trimebutine 200mg três vezes por dia, meia hora antes das refeições e, ao outro grupo, probiótico em comprimido contendo 60mg de duas espécies bacterianas, as *L. acidophilus* e as *B. infantis*, 2 vezes por dia, 1 hora depois das refeições durante três meses. Observou que o grupo que tomou o probiótico apresentou melhorias significativas relativamente à dor abdominal e ao inchaço apresentando uma pequena melhoria na obstipação (Georgescu, 2016).

Magistrelli *et al.* (2019) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar os efeitos dos probióticos no crescimento celular. Para este efeito, cultivaram células mononucleares de sangue periférico isoladas de doentes com DP e de indivíduos saudáveis na presença de probióticos. Foram testadas seis estirpes bacterianas: *Lactobacillus salivarius LS01*, a *L. plantarum*, a *L. acidophilus*, a *L. rhamnosus*, a *B. animalis subsp. Lactis* e a *B. breve*. Observou que todas as estirpes probióticas inibiam a produção de citocinas inflamatórias e a produção de espécies reativas de oxigênio em ambos os grupos do estudo. No entanto, os resultados mais significativos obtiveram-se na cultura de células provenientes de doentes com DP na presença das estirpes *L. salivarius LS01* e *L. acidophilus* tendo-se observado a redução na produção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, and IL-17A (Interleucina 17A), e um aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e a IL-10. Neste estudo foi também verificado que os probióticos inibiram o crescimento de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia in vitro*. Os resultados obtidos sugerem que os probióticos são ferramentas promissoras no tratamento da DP através da diminuição da resposta inflamatória, do stresse oxidativo e consequente neuro-inflamação e também controlando o crescimento das bactérias potencialmente patogénicas (Magistrelli *et al.*, 2019).

Apesar de algumas limitações apresentadas em diversos estudos realizados nesta área, os resultados obtidos sugerem a importância dos probióticos na DP, no entanto, mais estudos clínicos devem ser realizados.

2.6.3. Doença de Alzheimer

DA é uma doença neuro-degenerativa, descrita pela primeira vez em 1907 por Alois Alzheimer, sendo a forma mais comum de demência em idosos, caracterizada por perda progressiva e irreversível de diversas funções cognitivas como memória, atenção, concentração e linguagem, o que provoca alterações no comportamento, na personalidade e na capacidade funcional do indivíduo, dificultando a realização das atividades da vida diária (Giau *et al.*, 2018; Morris *et al.*, 2018; Rubio-Perez e Morillas Ruiz, 2012).

A etiologia da doença ainda não é bem conhecida, apesar de terem surgido várias hipóteses, como por exemplo a do modelo clássico da “Cascata de Amilóide”. Este modelo sugere que a doença surge como consequência da produção excessiva de péptido β -amilóide e consequente deposição nas fibras das células nervosas do SNC, iniciando-se um processo neuro-inflamatório característico desta patologia (Giau *et al.*, 2018). No entanto, estudos recentes sugerem que este modelo não explica na totalidade a patogénese desta doença, pensando-se que esta possa estar relacionada com a ativação da resposta inflamatória. Isto apoia a ideia de que alterações no microbiota intestinal ou metabolitos produzidos pelo microbiota possam desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão da doença atuando por várias vias no EMIC, como foi mencionado anteriormente (Bostanviklioglu, 2018; Cattaneo *et al.*, 2016; Minter *et al.*, 2016; Morris *et al.*, 2018). O microbiota intestinal pode secretar moléculas de sinalização com efeito pró-inflamatório e ativador da resposta imunológica. Estas moléculas através da circulação linfática e sistémica, podem atingir o SNC, levando a alterações do comportamento e à modulação da plasticidade do cérebro e da sua função cognitiva. Assim, para além do seu papel no desenvolvimento de doenças neurológicas crónicas como a EM e DP, o microbiota pode estar, também, relacionado com o desenvolvimento da doença neuro-degenerativa DA (Cattaneo *et al.*, 2016). O papel do microbiota no desenvolvimento da DA ainda não está muito esclarecido, no entanto, estudos recentes sugerem ocorrência de disbiose também nesta patologia.

Foram realizados estudos recorrendo ao modelo animal representativo desta doença, os ratinhos APP transgénicos. Estes animais são gerados a partir de ratinhos com background C57BL/6 e que co-expressam a mutação Sueca KM670/671NL da proteína precursora da amiloide humana (APP) e a mutação L166P da presenilina humana 1 (PS1)

sob controlo do promotor Thy-1, e que apresentam acumulação, dependente da idade, de placas parenquimatosas A β amiloides. Harach *et al.* (2017) comparou a diversidade do microbiota intestinal entre ratinhos APP-PS1 e ratinhos normais da estirpe selvagem (*wild-type*). Para tal recolheu amostras de fezes de ambos os grupos e após análise genética verificou que os ratinhos APP-PS1 apresentavam menor diversidade microbiana do que os *wild-type*, tendo verificado diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos aos 8 meses de idade relativamente à proporção relativa dos filos Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Tenericutes, Proteobacteria e Actinobacteria, o que apoia a ideia de que alterações na composição do microbiota possam contribuir para o desenvolvimento de DA. Harach e colaboradores também compararam ratinhos APP-PS1-GF com ratinhos APP-PS1 criados em condições normais verificando que os primeiros apresentavam uma redução acentuada de péptido β -amilóide e consequente diminuição da patologia cerebral. Verificaram também que, após colonização dos ratinhos APP-PS1-GF com o microbiota de ratinhos APP criados em condições normais, os ratinhos GF apresentavam mais propensão para desenvolver a patologia associada à acumulação do péptido β -amilóide do que quando colonizados com o microbiota intestinal proveniente dos ratinhos *wild-type* (Harach *et al.*, 2017).

Minter *et al.* (2016) também recorreram ao modelo animal de DA, os ratinhos APP, para analisar o papel do microbiota intestinal na regulação da produção do péptido de β -amilóide. Neste estudo recolheram amostras de fezes e verificaram que alterações na composição e diversidade do microbiota intestinal induzidas pelo tratamento prolongado com antibióticos de largo espectro diminuía a deposição de placa β -amilóide e a alteração morfológica da microglia alterando a composição das moléculas inflamatórias na circulação periférica, o que influenciou a resposta neuro-inflamatória. O efeito do microbiota na microglia (macrófagos residentes do SNC), sugere que a diversidade do microbiota intestinal pode ter um importante efeito modulador dos mecanismos de imunidade inata do hospedeiro (Minter *et al.*, 2016).

Cattaneo *et al.* (2016) realizou um estudo clínico em humanos avaliando a possível associação entre a amiloidose cerebral e a composição do microbiota intestinal, estudando a atividade pro- e anti-inflamatória e a inflamação periférica em pacientes apresentando alterações cognitivas. Cattaneo e a sua equipa recolheram amostras de fezes para avaliar

a diversidade do microbiota e amostras de sangue para avaliar a expressão de citocinas pro e anti-inflamatórias em três grupos de estudo: um grupo composto por pacientes com alterações cognitivas apresentando amiloidose, outro grupo composto por indivíduos com alterações cognitivas mas não apresentando amiloidose e por fim um grupo controle em que os indivíduos não apresentavam nem alterações cognitivas nem amiloidose. Os resultados obtidos revelaram que um aumento dos grupos taxonômicos microbianos com atividade pro-inflamatória como os gêneros *Escherichia/Shigella*, e a redução na abundância de espécies com características anti-inflamatórias como a *Eubacterium rectale*, poderão estar relacionados com o estado inflamatório periférico apresentado pelos pacientes com alterações cognitivas e amiloidose cerebral sugerindo que as alterações da composição do microbiota podem induzir a neuro-degeneração e a perda cognitiva apresentada pelos doentes de DA (Cattaneo *et al.*, 2016).

Sabe-se que algumas bactérias e fungos, que compõem o microbiota intestinal, secretam a proteína amiloide, podendo a sua acumulação no SNC ser um fator de risco no desenvolvimento da DA (Hill e Lukiw, 2015).

Outras espécies bacterianas parecem ser mais numerosas em doentes com DA e podem contribuir para produzir ou agravar a produção de placas de β -amilóide, como *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp. (Westfall *et al.*, 2017). O desequilíbrio no microbiota provoca um aumento da permeabilidade intestinal e disfunção neurológica, tornando-se o microbiota um alvo de terapia probiótica nesta patologia (Kowalski e Mulak, 2019; Westfall *et al.*, 2017).

Foram realizados poucos estudos para avaliar os efeitos dos probióticos na prevenção, atenuação e tratamento da DA. No entanto, como mencionado acima relativamente a outras patologias, a suplementação oral com probióticos tem efeitos positivos ao nível cerebral prevenindo a neuro-inflamação e a oxidação.

Divyashri *et al.* (2015) realizaram um estudo com o objetivo de analisar os atributos probióticos, e o potencial antioxidante, anti-inflamatório e neuromodulador dos *Enterococcus faecium* CFR 3003. Verificaram que esta estirpe apresentava elevada tolerância ao stress gastrointestinal (tolerância ao ácido, pepsina, tripsina e bÍlis). Verificaram também que *E. faecium* exibiu capacidade antioxidante significativa. E.

faecium CFR 3003 e *L. rhamnosus* GG MTCC 1408 demonstraram também ação anti-inflamatória quando adicionados a cultura da linha celular de macrófagos J774A, induzindo a redução da produção de TNF- α por estas células. Estes resultados sugerem que a suplementação com probióticos contendo as duas espécies pode ter um efeito importante na redução da neuro-inflamação. Divyashru *et al* realizaram também estudos *in vivo*, recorrendo ao modelo animal de ratinhos CFT Swiss, masculinos (para eliminar possível interferência hormonal nos resultados). Formaram quatro grupos experimentais: o grupo I, grupo controlo suplementado com solução salina; o grupo II suplementado com *E. faecium* 10⁴ CFU; o grupo III suplementado com *E. faecium* 10⁸ CFU; e o grupo IV, com ratinhos que foram suplementados com *L. rhamnosus* 10⁸ CFU durante 28 dias consecutivos. Os resultados demonstraram a redução dos marcadores de stress oxidativo e indução de enzimas antioxidantes no cérebro, nos grupos suplementados com probióticos (Divyashri *et al.*, 2015).

Akbari *et al.* (2019) realizaram um estudo clínico com o objetivo de analisar os efeitos da suplementação com probióticos na função cognitiva e no estado metabólico. Avaliaram dois grupos, ambos compostos por pacientes com DA, administrando a um dos grupos 200ml por dia de leite suplementado com probiótico contendo *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum*, e *L. fermentum* (2 × 10⁹ CFU/g de cada espécie) e ao outro grupo, grupo controlo, administraram apenas 200ml de leite sem suplemento de probióticos tendo concluído que a suplementação afetou positivamente a função cognitiva dos pacientes com DA (Akbari *et al.*, 2016).

Evidências sugerem que a adaptação da dieta com probióticos poderá ser interessante, uma vez que permite manipular o microbiota intestinal, funcionando como terapia e melhorando o funcionamento do SNE e do SNC. A revisão bibliográfica desenvolvida por Kowalski e Mulak (2019) apresenta resultados recentes, baseados em estudos animais e observações clínicas, sobre o papel da desregulação do EMIC na patogénese da DA e abordaram, também, possíveis terapêuticas para a DA através da modulação do microbiota intestinal com a implementação de uma dieta saudável com ingestão elevada de vegetais, probióticos e antioxidantes e diminuição da ingestão de outros alimentos como açúcar refinado, gorduras saturadas e proteínas de origem animal. Este estudo

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

sugeriu um impacto positivo da dieta saudável na diminuição do risco de desenvolver neuro-degeneração e por consequência DA (Kowalski e Mulak, 2019).

III. Conclusão e Perspetivas Futuras

Com a realização desta revisão bibliográfica tornou-se óbvio que o microbiota intestinal pode desempenhar um papel importante na regulação da neuroinflamação e que a disbiose pode ser promotora do desenvolvimento de algumas doenças neurodegenerativas.

Alguns trabalhos de investigação foram citados no decorrer da elaboração desta revisão bibliográfica. Embora esses estudos sugiram haver um benefício resultante do uso de probióticos na prevenção, melhoria dos sintomas e tratamento são necessários mais estudos para avaliar as propriedades imunomoduladoras e a segurança, a longo prazo, do uso de probióticos em situação de patologia neuro-degenerativa, avaliando possíveis interações positivas com outros medicamentos no tratamento das doenças abordadas.

É importante esclarecer melhor se a ação anti-inflamatória dos probióticos referida em diferentes estudos poderá estar associada a melhorias nos sintomas dos pacientes com doenças neuro-degenerativas.

A revisão bibliográfica realizada apoia que tanto o EMIC como a disbiose desempenham um papel importante no desenvolvimento da EM, da DP e da DA sugerindo que um microbiota intestinal saudável poderá diminuir o risco de desenvolver essas doenças. Seria pertinente no futuro clarificar o efeito dos metabolitos produzidos e libertados por organismos probióticos, o que poderá ajudar na escolha das espécies de probióticos mais aconselháveis para cada caso, permitindo a personalização terapêutica.

Outro aspeto a considerar no futuro é uma melhor avaliação dos possíveis efeitos dos probióticos administrados sobre a população bacteriana intestinal residente dos pacientes com doença neurodegenerativa. Um melhor conhecimento dos mecanismos de ação das espécies probióticas que já são reconhecidas por serem benéficas e a investigação de outros grupos taxonómicos que possam ter também potencial terapêutico isoladamente ou em combinação com outros, poderá levar à elaboração de probióticos mais específicos e eficazes para cada caso. Estes estudos deverão também permitir definir qual a duração do tratamento e as dosagens apropriadas. Assim, os probióticos poderão constituir uma importante arma terapêutica na prevenção e tratamento das doenças inflamatórias, particularmente das neurodegenerativas.

IV. Bibliografia

Akbari E., Asemi Z., Kakhaki R. D., *et al.* (2016). Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial. *Front. Aging Neurosci.*, 8, pp. 1-8.

Berer K., Mues M., Koutrolos M., *et al.* (2011). Commensal Microbiota and Myelin Autoantigen Cooperate to Trigger Autoimmune Demyelination. *Nature*, 479, pp. 538-542.

Berick P., Denou E., Collins J., *et al.* (2011). The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Behavior in Mice. *Gastro.*, 141, pp. 599-609.

Bostanciklioglu M. (2018). Intestinal Bacterial Flora and Alzheimer's Disease. *Neurophy.*, 50, pp. 140-148.

Bravo J.A., Forsythe P., Chew M. V., *et al.* (2011). Ingestion of Lactobacillus Strain Regulates Emotional Behavior and Central GABA Receptor Expression in a Mouse Via the Vagus Nerve. *PNAS*, 108, pp.16050-16055.

Caputi V., Giron M. C. (2018). Micobiome-Gut-Brain Axis and Toll-Like receptors in Parkinson Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, pp. 1689.

Carabotti M., Scirocco A., Maselli M. A., *et al.* (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann.of Gast*, 28, pp. 203-209.

Cattaneo A., Cattane N., Galluzzi, S., *et al.* (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol. Aging*, 49, pp. 60-68.

Chen J., Chia N., Kalari K. R., *et al.* (2016). Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.*, 6, pp. 1-10.

Chen J., Rao J. N., Zou T., *et al.* (2007). Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 293, pp. G568-G576.

Clarke G., Stilling R. M., Kennedy P. J., *et al.* (2014). Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol. Endocrinol.*, 28, pp. 1221-1238.

Cosorich L., Dalla-Costa G., Sorini C., *et al.* (2017). High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Sci. Adv.*, 3, pp. 1-9.

Dimitri E., Christodoulides S., Scot S. M. *et al.* (2017). Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on the Gut Motility and Constipation. *Adv. Nutr.*, 8, pp. 484-494.

Dinan T. G., Cryan J. F. (2017). Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J. Physiol.*, 595, pp. 489-503.

Divyashri G., Krishna G., Muralidhara *et al.* (2015). Probiotic Attributes, Antioxidant, Anti-inflammatory and Neuromodulatory Effects of *Enterococcus faecium* CFR 3003: *in vitro* and *in vivo* Evidence. *J. Med. Microb.*, 64, pp. 1527-1540.

Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., *et al.* (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 308, pp. 1635-1638.

Flint H. J., Duncan S. H., Scott K. P. *et al.* (2015). Links Between Diet, Gut Microbiota Composition and Gut Metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 74, pp. 13-22.

Faden A. L., Loane D. J. (2015). Chronic Neurodegeneration After Traumatic Brain Injury: Alzheimer Disease, Chronic Traumatic Encephalopathy, or Persistent Neuroinflammation? *Neuroth.* 12, pp. 143-150.

Frei R., Frestl R., Konieczna P. *et al.* (2013). Histamine receptor 2 modifies dendritic cell responses to microbial ligands. *J. Allergy Clin Immunol.*, 132, pp. 194-204.

Fujiya M., Musch M. W., Nakagawa Y., *et al.* (2007). The *Bacillus subtilis* Quorum-Sensing Molecule CSF Contributes to Intestinal Homeostasis via OCTN2, a Host Cell Membrane Transporter. *Cell Host & Microbe*, 1, pp. 299-308.

Ganesh B. P., Hall A., Ayyaswamy S., *et al.* (2018). Diacylglycerol Kinase Synthesized by Commensal *Lactobacillus reuteri* Diminishes Protein Kinase C Phosphorylation and

Histamine-Mediated Signaling in the Mammalian Intestinal Epithelium. *Mucosal Immunol.*, 11, pp. 380-393.

Gao C., Major A., Rendon D., *et al.* (2015). Histamine H2 Receptor-Mediated Suppression of Intestinal Inflammation by Probiotic *Lactobacillus reuteri*. *mBio.*, 6, pp. 1-12.

Gasbarrini G., Gramenzi A. (2016). Probiotics History. *J. Clin. Gast.*, 50, pp. S116-S119.

Gazerani P. (2019). Probiotics for Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, pp. 1-26.

Georgescu D. , Ancusa O. E., Georgescu L. A., *et al.* (2016). Nonmotor gastrointestinal disorders in older patients with Parkinson's disease: is there hope? *Clin. Interv. Aging*, 11, pp. 1601-1608.

Giau V. V., Wu S. Y., Jamerlan A., *et al.* (2018). Gut Microbiota and Their Neuroinflammatory Implications in Alzheimer's Disease. *Nutrients*, 10, pp. 1765.

Grenham S., Clarke G., Cryan J. F., *et al.* (2011). Brain–gut–microbe communication in health and disease. *Front. Physiol.*, 2, pp 1-15.

Harach T., Marungruang N., Duthilleul N., *et al.* (2017). Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci. Rep.*, 7, pp. 1-13.

He B., Hoang T., Tran D. Q., *et al.* (2017). Adenosine A_{2A} Receptor Deletion Blocks the Beneficial Effects of *Lactobacillus reuteri* in Regulatory T-Deficient Scurfy Mice. *Front. Immunol.*, 8, pp. 1-9.

He B., Hoang T. K., Wang T. *et al.* (2017) Resetting Microbiota by *Lactobacillus reuteri* Inhibits T reg Deficiency–Induced Autoimmunity Via Adenosine A_{2A} Receptors. *J. Exp. Med.*, 214, pp. 107-123.

He B., Hoang T. K., Tian X., *et al.* (2018). *Lactobacillus reuteri* Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice by Modulating Gut Microbiota. *Front. Immunol.*, 10, pp. 1-12.

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

- Hempel S., Newberry S. J., Maher A. R. *et al.* (2012). Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea: a Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA*, 307, pp. 1959-1969.
- Hill J. M., Lukiw W. J. (2015). Microbial-generated amyloids and Alzheimer's disease (AD). *Front. Aging Neurosci.*, 7, pp. 1-5.
- Hold G. L., Pryde S. E., Russel V. J., *et al.* (2002). Assessment of Microbial Diversity in Human Colonic Samples by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microb. Ecol.*, 39, pp. 33-39.
- Islam S. U. (2016). Clinical Uses of Probiotics. *Medicine*, 95, pp. 1-5.
- Jangi S., Gandhi R., Cox L. M., *et al.* (2016). Alterations of the Human Gut Microbiome in Multiple Sclerosis. *Nat. Comm.* 7, pp. 1-11.
- Javanemard A., Ashtari S., Sabet B. *et al.* (2018). Probiotics and Their Role in Gastrointestinal Cancers Prevention and Treatment; an Overview. *Gastroenterol. Hepatol.* 11, pp. 284-295.
- Keller L., Surette M. G. (2006). Communication in Bacteria: an Ecological and Evolutionary Perspective. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, pp. 249-258.
- Kim K., Kim Y. U., Koh B. H., *et al.* (2010). HHQ and PQS, Two *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecules, Down-Regulate the Innate Immune Responses Through the Nuclear Factor- κ B Pathway. *Immunol.*, 129, pp. 578-588.
- Kim Y., Lee D., Kim D. *et al.* (2008). Inhibition of Proliferation in Colon Cancer Cell Lines and Harmful Enzyme Activity of Colon Bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212. *Arch. Pharm. Res.*, 31, pp. 468-473.
- Kumar M. , Kumar A., Nagpal R., *et al.* (2010). Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int. J. Food Science Nutr.*, 61, pp. 473-496.
- Lee Y. K., Menezes J. S., Umesaki Y., *et al.* (2011). Proinflammatory T-cell Responses to Gut Microbiota Promote Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PNAS*, 108, pp. 4615-4622.
- Leung A. K. C., Leung A. A. M., Wong A. H. C *et al.* (2019). Travelers' Diarrhea: A Clinical Review. *Recent Patents on Infla. & Allergy Drug. Disc.*, 13, pp. 38-48.

- Li Y., Innocentin S., Withers D. R., *et al.* (2011). Exogenous Stimuli Maintain Intraepithelial Lymphocytes via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Cell*, 147, pp. 629-640.
- Lin L., Zhang J. (2017). Role of Intestinal Microbiota and Metabolites on gut Homeostasis and Human Diseases. *BMC Immunology*, 18, pp. 1-25.
- Liong M. (2008). Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated Mechanisms and *In-Vivo* Evidence. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, pp. 854-863.
- Liu L., Guo X., Rao J. N., *et al.* (2009). Polyamines Regulate E-cadherin Transcription Through c-Myc Modulating Intestinal Epithelial Barrier Function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 296, pp. C801-C810.
- Liu Y., Alookaran J. J., Rhoads J. M. (2018). Probiotics in Autoimmune and Inflammatory Disorders. *Nutrients*, 10, pp. 1537
- Magistrelli L., Amoruso A., Mogna L., *et al.* (2019). Probiotics May Have Beneficial Effects in Parkinson's Disease: *In vitro* Evidence. *Front. Immunol.*, 10, pp. 1-9.
- Mangalam A., Shahi S. K., Luckey D., *et al.* (2017). Human Gut-derived Commensal Bacteria Suppress Central Nervous System Inflammatory and Demyelinating Disease. *Cell Rep.*, 20, pp. 1269-1277.
- Matsumoto M., Kurihara S., Kibe R., *et al.* (2011). Longevity in Mice Is Promoted by Probiotic-Induced Suppression of Colonic Senescence Dependent on Upregulation of Gut Bacterial Polyamine Production. *Plos ONE*, 6, pp. 1-12.
- Manor O., Dai C. L., Kornilov S. A. *et al.* (2020). Health and Disease Markers Correlate With Gut Microbiome Composition Across Thousands of People. *Nat. Commun.*, 11, pp. 1-12.
- Martin C. R., Osadshiy V., Kalani A., *et al.* (2018). The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 6, pp. 133-148.
- Mayer E.A., Tillisch K., Gupta A. (2015). Gut/Brain Axis and the Microbiota. *The J. Clin. Inv.*, 125, pp. 926-938.

Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K., et al. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J. Mol. Biol.*, 427, pp. 3389-3406.

Minois N., Carmona-Gutierrez D., Madeo F. (2011). Polyamines in aging and disease. *Aging*, 3, pp. 716-732.

Minter M. R., Zhang C., Leone V., et al (2016). Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Scient. Rep.*, 6, pp. 1-12.

Miyake S., Kim S., Suda W., et al. (2015). Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *Plos One*, 10, pp. 1-16.

Morshedi M., Hashemi, R., Moazen S., et al. (2019). Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effects of Probiotics in Multiple Sclerosis: a Systematic Review. *J. Neuro.*, 16, pp. 1-11.

Morris G., Berk M., Maes M., et al. (2018). Could Alzheimer's Disease Originate in the Periphery and If So How So? *Mol. Neurobiol.*, 56, pp. 406-434.

Ochoa-Repáraz J., Mielcarz D. W., Ditrio L. E., et al. (2009). Role of Gut Commensal Microflora on in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelites. *J. Immunol.*, 183, pp. 6041-6050.

Ochoa-Repáraz J., Mielcarz D. W., Ditrio L. E., et al. (2010). Central nervous system demyelinating disease protection by the human commensal *Bacteroides fragilis* depends on polysaccharide A expression. *J. Immunol.*, 185, pp. 4101-4108.

Orlando A., Refolo M. G., Messa C. et al. (2012). Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Viable or Heat-Killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 Gastric and DLD-1 Colon Cell. Lines. *Nut. and Cancer*, 64, pp. 1103-1111.

- Okamoto K., Fujyia M., Nata T., *et al.* (2012). Competence and Sporulation Factor Derived From *Bacillus subtilis* Improves Epithelial Cell Injury in Intestinal Inflammation Via Immunomodulation and Cytoprotection. *Int. J. Colorectal Dis.*, 27, pp. 1039-1046.
- Ottman N., Smidt H., Vos W. M., *et al.* (2012). The Function of Our Microbiota: Who Is Out There and What Do They Do? *Fro. in Cel. and Inf. Mic.*, 2, pp. 1-11.
- Quigley E. M. M. (2017). Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr. Neuro. Neuro. Rep.* 17, pp. 1-9.
- Radbakrishanan D. M., Goyal V. (2018). Parkinson's disease: A review. *Neurol. India*, 66, pp. 26-35.
- Rafter J. (2004). The Effects of Probiotics on Colon Cancer Development. *Nut. Res. Rev.* 17, pp. 277-284.
- Rao R. K., Samak G. (2013) Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Curr. Nutr. Food Sci.*, 9, pp. 99 – 107.
- Rogers G. B., Keating D. J., Young R. L., *et al.* (2016). From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol. Psych.* 21, pp. 738-748.
- Rooks, M. G., Garrett W. S. (2016). Gut Microbiota, Metabolites and Host Immunity. *Nature Reviews*, 16, pp. 341-352.
- Rothhammer V., Mascalfroni I. D., Bunse L., *et al.* (2016). Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and CNS inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat. Med.*, 6, pp. 586-597.
- Rubio-Perez J. M., Morillas-Ruiz J. M. (2012). A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *Scient. World J.*, 2012, pp. 1-15.
- Sampson T. R., Debluis J. W., Thron T., *et al.* (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, 167, pp. 1469-1480.

Salonen A., Lahti L., Salojärvi J., *et al.* (2014). Impact of Diet and Individual Variation on Intestinal Microbiota Composition and Fermentation Products in Obese Men. *Int. Soc. Micro. Eco.*, 8, pp. 2218-2230.

Shen T., Yue Y., He T., *et al.* (2021). The Association Between the Gut Microbiota and Parkinson's Disease, a Meta-Analysis. *Front. Aging Neurosci.*, 13, pp. 1-12.

Sharifi-Rad J., Rodrigues C. F., Stojanović-Radić Z., *et al.* (2020). Probiotics: Versatile Bioactive Components in Promoting Human Health. *Medicina*, 56, pp. 1-30.

Sivieri K., Morales M. L. V., Adorno M. A. T., *et al.* (2013). Lactobacillus Acidophilus CRL 1014 Improved “Gut Health” in the SHIME® Reactor. *BMC Gastr.*, 13, Pp. 1-9.

Sleeth M. L., Thompson E. L., Ford H. E., *et al.* (2010). Free Fatty Acid Receptor 2 and Nutrient Sensing: a Proposed Role for Fibre, Fermentable Carbohydrates and Short-Chain Fatty Acids in Appetite Regulation. *Nutr. Resear. Rev.*, 23, pp. 135-145.

Smith P. D., Smythies L. E., Shen R., *et al.* (2011). Intestinal Macrophages and Response to Microbial Encroachment. *Mucos. Immunol.* 4, pp. 1-21.

Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. (2020). Probiotics in Medicine: A Long Debate. *Font. Immun.*, 11, pp. 1-20.

Thomas C. M., Hong T., Pijkeren J. P. van, *et al.* (2012). Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling. *PlosOne*, 7, pp. 1-15.

Umbrello G. , Esposito S. (2016). Microbiota and neurologic diseases: potential effects of probiotics. *J. Trans.l Med.*, 14, pp. 1-11.

Wallace C. J. K., Milev R. (2017). The effects of probiotics on depressive symptoms in humans: a systematic review. *Ann Gen Psychiatry*, 16, pp. 1-10.

Walker A. W., Ince J., Duncan S., H., *et al.* (2011). Dominant and Diet-Responsive Groups of Bacteria Within the Human Colonic Microbiota. *Int. Soc. Micro. Ecol.*, 5, pp. 220-230.

Wang Y., Kasper L. H. (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav. Immun.*, 38, pp. 1-12.

Probióticos e Efeitos Terapêuticos em Patologias do Sistema Nervoso Central

Westfall S., Lomis N., Kahouli I., *et al.* (2017). Microbiome, Probiotics and Neurodegenerative Diseases: Deciphering the Gut Brain Axis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 74, pp. 3769-3787.

Wilkins T., Sequoia J. (2017). Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Ame. Fam. Phy.*, 96, pp. 170-179

Wu S., Liu J., Liu C. *et al.* (2020). Quorum Sensing for Population-Level Control of Bacteria and Potential Therapeutic Applications. *Cell. Mol. Life Sci.*, 77, pp. 1319-1343.

Zelante T., Iannitti R. G., Cunha C., *et al.* (2013). Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Imm.* 39, pp. 372-385.