

Mara Andreia Pereira Gonçalves

Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Mara Andreia Pereira Gonçalves

Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Mara Andreia Pereira Gonçalves

Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo

Atesto a originalidade do trabalho:

(Mara Andreia Pereira Gonçalves)

Projeto de Pós Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador:

Professora Doutora Amélia Maria Marques da Silva Rodrigues Sarmento Assunção

Porto, 2014

Resumo

O microbiota intestinal é o conjunto dos microrganismos que existem no intestino humano. O microbioma intestinal diz respeito ao genoma desses microrganismos. Estes microrganismos estabelecem com o hospedeiro uma relação de mutualismo, em que ambos contribuem e beneficiam.

O microbiota intestinal é bastante diversificado e numeroso. Com o progresso de técnicas de genética, o avanço no estudo do microbioma foi conseguido, permitindo a classificação do microbiota. Estudos de metagenômica, metatranscriptômica, metaproteômica e metametabolômica, permitiram descrever a diversidade de espécies microbianas existentes no intestino. O microbiota intestinal caracteriza-se pelo seu constante dinamismo, sendo que este pode ser afetado por inúmeros fatores ambientais como dieta, estilo de vida, consumo de antibióticos e idade.

O desenvolvimento do microbiota ocorre logo após o nascimento e vai ter influência na fisiologia do hospedeiro, nomeadamente no desenvolvimento e morfogênese de órgãos e na manutenção do equilíbrio de tecidos e órgãos. Irá também contribuir para o desempenho de funções metabólicas, principalmente na obtenção de energia a partir da dieta e no desenvolvimento do sistema imunológico. O desenvolvimento adequado tanto do GALT (isto é, do tecido linfóide associado à mucosa intestinal, que constitui o sistema imunológico do trato gastrointestinal), como da tolerância imunológica, são de extrema importância para o hospedeiro pois permitem que este seja menos suscetível a desenvolver patologias.

Alterações no microbiota estão associadas a diversas doenças como diabetes tipo 1, obesidade, do foro cardiovascular, entre outras. Por sua vez, estas patologias podem causar uma modificação considerável do microbiota e suas funções, afetando a relação de simbiose com o hospedeiro. Se ocorrer uma alteração extensa do microbiota, poderá ser necessário recorrer ao uso de probióticos, prebióticos e, em último recurso, transplante fecal para se poder restabelecer ou modificar a microbiota intestinal, minimizando os danos causados.

O estudo do microbiota humano e, em particular, do microbiota intestinal está em franco desenvolvimento, tendo vindo a surgir novas evidências relativamente à sua associação a diferentes patologias e ao seu papel na fisiologia humana.

Abstract

The gut microbiota is composed by the microorganisms that exist in the human intestine. The gut microbiome refers to the genome of these organisms. The gut microorganisms live in mutualism with the host, both contributing to and benefiting of each other.

The gut microbiota is quite diverse and numerous. With the progress of genetic techniques, advances in the study of the microbiome has been achieved, allowing classification of the microbiota. Metagenomic studies, metatranscriptomics, metaproteomics and metametabolomics allowed to describe the diversity of microbial species in the intestine. The intestinal microbiota is characterized by its constant dynamics, and can be affected by many environmental factors such as diet, lifestyle, age and antibiotic consumption.

The development of the microbiota occurs soon after birth and will influence the physiology of the host, including the development and organ morphogenesis and in maintaining the homeostasis of tissues and organs. It will also contribute to the performance of the metabolic functions, particularly in the production of energy from the diet and development of the immune system. The proper development of both GALT (i.e. the lymphoid tissue associated with the intestinal mucosa, which is the immune system of the gastrointestinal tract), and of immune tolerance, are extremely important to the host because they contribute to a lower susceptibility to disease development.

Changes in the microbiota are associated with various diseases such as type 1 diabetes, obesity, cardiovascular diseases, among others. On the other hand, these diseases may also cause considerable modification of the microbiota and its functions, affecting the symbiotic relationship with the host. If an extensive alteration of the microbiota occurs, the use of probiotics, prebiotics or even fecal transplantation may be necessary to restore or modify the intestinal microbiota, minimizing damage.

The study of the human microbiota and, in particular, of the intestinal microbiota is rapidly developing, with new evidences regarding their association with different pathologies and their role in human physiology.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Amélia Assunção, minha orientadora, pela sua ajuda, disponibilidade e atenção para a realização desta dissertação.

Agradeço os meus amigos, que nunca me deixaram desanimar apoiando-me sempre de forma incondicional e que desta forma, contribuíram para a realização desta dissertação.

Agradeço de forma especial aos meus pais e ao meu irmão por me terem ajudado através do seu afeto, amor e incentivo a concretizar o curso de Ciências Farmacêuticas, pois sem eles nada disto seria possível.

A todos um *MUITO OBRIGADA!!*

Índice

I. Introdução.....	1
1.1. Objetivos.....	2
1.2. Metodologia.....	3
II. Microbiota Intestinal.....	4
2.1. Composição e diversidade do microbiota intestinal.....	4
2.2. Desenvolvimento do microbiota intestinal.....	5
2.3. Métodos de sequenciação e análise para pesquisa do microbioma e microbiota intestinal.....	7
2.4. Fatores que afetam a composição do microbiota intestinal.....	9
2.5. Impacto do microbiota na fisiologia do hospedeiro.....	11
2.6. Microbiota e sistema imunológico intestinal.....	13
2.7. Microbiota e metabolismo.....	16
III. Patologias associadas à composição do microbiota intestinal.....	18
3.1. Obesidade e Resistência à Insulina.....	18
3.2. Doenças cardiovasculares.....	19
3.3. Diabetes tipo 1.....	20
3.4. Doença inflamatória intestinal.....	21
3.5. Doenças neurológicas.....	22
IV. Terapia medicamentosa para possível tratamento de patologias associadas a alteração do microbiota intestinal.....	25
4.1. Probióticos.....	25
4.2. Prebióticos.....	27
4.3. Intervenção na dieta.....	28
4.4. Transplante fecal.....	29
V. Perspetivas Futuras.....	30
VI. Conclusão.....	31

VII. Referências Bibliográficas 32

Índice de figuras

Figura 1. Composição e concentrações de espécies microbianas dominantes em diferentes regiões do trato gastrointestinal.....	5
Figura 2. Representação da alteração do microbiota intestinal ao longo do tempo.....	7
Figura 3. Representação de fatores ambientais que composição do microbiota intestinal.....	11
Figura 4. Representação do desenvolvimento imunológico induzido pelo microbiota intestinal.....	14
Figura 5. Representação do metabolismo da colina.....	20

Abreviaturas

AGCC – Ácidos gordos de cadeia curta

BSF – Bactérias segmentadas filamentosas

CD – Células dendríticas

DC – Doenças cardiovasculares

DII – Doença inflamatória intestinal

DM1 – Diabetes *mellitus* tipo 1

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)

FXR – *Farnesoid X receptor*

GALT – Tecidos linfóides associados à mucosa do intestino

GLP-1 – *Glucagon-Like peptide-1*

GPCRs – Recetores acoplados à proteína G (do inglês: *G protein coupled receptor*)

HMP – Projeto Microbioma Humano (do inglês: *Human Microbiome Project*)

IL-10 – Interleucina-10

IgA – Imunoglobulina A

LPS – Lipopolissacarídeos

LTi-células – Células indutoras do tecido linfóide

MALT – Tecidos linfóides associados à mucosa

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response gene 8*

NGS – *Next-Generation Sequencing*

NK – Células *Natural Killer*

NLM – Nódulos linfáticos mesentéricos

NOD – *Non-obese diabetic*

NOD1 – *Nucleotide-binding oligomerization domain - 1*

NOD2 – *Nucleotide-binding oligomerization domain – 2*

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês: *Pathogen-associated molecular patterns*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)

PP – Placas de *Peyer*

PRR – Recetor de Reconhecimento de Padrões (do inglês: *Pattern Recognition Receptor*)

PSA – Polissacarídeo A

Pyy – Péptido yy

rRNA – Ácido Ribonucleico ribossomal (do inglês: *ribosomal ribonucleic acid*)

SI – Sistema imunológico

TF – Fator tecidual

TGF β – Fator de transformação do crescimento beta (do inglês: *Transforming growth factor beta*)

TLRs – Recetores como os *Toll-like*

TMA – Trimetilamina

TMAO – Trimetilamina-N-óxido

Treg – Células T reguladoras

I. Introdução

O interesse em estudar o microbioma humano, a sua diversidade e as interações humano – microrganismo tem vindo a desenvolver-se nos últimos anos, embora todo o conhecimento que se possui nas diversas áreas da ciência é resultado de séculos de questões, de observações e de pesquisas (Fiocchi e Pereira de Sousa, 2012).

Antonie Van Leeuwenhoek foi quem primeiro estudou a diversidade do microbiota humano, comparando o microbiota oral e fecal (Bakhtiar *et al.*, 2013).

O microbiota humano, de uma forma simplificada, é o conjunto de microrganismos que habita no organismo humano. Existe uma relação de simbiose entre o organismo humano e os microrganismos que aí residem, tirando ambos benefícios desta associação (Lozupone *et al.*, 2012).

O organismo humano adulto sustenta, de forma saudável, uma comunidade de microrganismos incluindo bactérias, *archaea*, *eucarya*, vírus e seus elementos genéticos que constituem o microbiota humana (Fiocchi e Pereira de Sousa, 2012). Alguns autores consideram microbiota e microbioma termos sinónimos (Ursell *et al.*, 2012). Contudo, outros autores consideram como microbiota o grupo de microrganismos que vivem num determinado local do organismo, enquanto o microbioma diz respeito aos genes que constituem o genoma desse mesmo grupo de microrganismos (Ley *et al.*, 2008). Esta última visão será a adotada ao longo deste trabalho.

Os organismos que constituem o microbiota humano estão distribuídos por diversos locais do organismo (como pele, vagina, boca, vias respiratórias e intestinos), colonizando assim zonas superficiais ou profundas. A sua distribuição depende de um conjunto de fatores como a humidade, acidez, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Os microrganismos estão em grande número no organismo humano, chegando a existir sensivelmente dez vezes mais células microbianas que células humanas (Fiocchi e Pereira de Sousa, 2012).

O trato gastrointestinal, mais precisamente o intestino, é o local do organismo humano que alberga maior número e diversidade de microrganismos, podendo o microbiota intestinal exercer a maior influência sobre os mecanismos homeostáticos humanos. Podem referir-se como exemplos a sua ação na digestão de alimentos e

produção de vitaminas B₁₂ e K, que têm impacto sobre a função e conservação da saúde do sistema digestivo e na saúde humana como um todo (Willey *et al.*, 2009). Além disso, o microbiota impede a proliferação de microrganismos patogénicos por competição, impedindo, desta forma, infeção por estes agentes (Fiocchi e Pereira de Sousa, 2012).

O desenvolvimento de técnicas de genética permitiram um estudo metagenómico, importante para descrever a diversidade de espécies microbianas existentes no intestino, que não seriam possíveis de detetar através de culturas bacterianas pois um grande número não é ainda cultivável (Madigan *et al.*, 2006; Preidis e Versalovic, 2009). O estudo detalhado da composição do microbiota intestinal e suas funções metabólicas permite determinar quais os microrganismos que tornam possível manter o intestino saudável e que alterações podem conduzir ao desenvolvimento de patologias (Preidis e Versalovic, 2009).

Nos últimos anos foi iniciado um programa de pesquisa internacional designado Projeto Microbioma Humano (HMP). O objetivo do HMP é caracterizar a diversidade do microbiota em humanos saudáveis e, desta forma, adquirir conhecimento sobre a composição do microbioma comensal que habita o organismo humano saudável e de que forma ele se encontra alterado em situações de patologia (Turnbaug *et al.*, 2007).

1.1. Objetivos

Esta dissertação tem como principal objectivo descrever o microbiota intestinal humano e de que forma este influencia o sistema imunitário e o metabolismo. A investigação destes fenómenos de inter-relação pode abrir portas à compreensão de certas patologias, como por exemplo a doença de Crohn ou a diabetes. Com estas descobertas pode-se ainda conseguir desenvolver fármacos mais eficientes com vista a uma melhor recuperação e melhoria da qualidade de vida do doente.

1.2. Metodologia

Para a concretização desta dissertação utilizaram-se vários motores de busca para a pesquisa de artigos como o Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), o Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>), o b-on (<http://www.b-on.pt/>) e também, o Google Académico (<http://scholar.google.pt/>).

As palavras-chaves como “Gut Microbiome”, “Metagenomic”, “Immunity System”, “Metabolism”, “Prebiotics”, “Probiotics” e “Fecal Transplant” foram utilizadas para procura de informação nos motores de busca. Também foram incluídas informações contidas em livros médicos. Este trabalho de revisão contém bibliografia que abrange datas entre 1998 a 2014.

II. Microbiota Intestinal

2.1. Composição e diversidade do microbiota intestinal

O microbiota intestinal é uma realidade complexa, não só pela diversidade de espécies de microrganismos que habitam o intestino, como também pela forma como eles interagem entre si e o hospedeiro (Lozupone *et al.*, 2012).

A composição do microbiota do intestino delgado, particularmente do duodeno, é semelhante à do estômago. Esta semelhança deve-se ao facto do duodeno ser a porção inicial do intestino onde chega o quimo, proveniente do estômago, e que tem características ácidas. Além disso, também é neste local que existem secreções biliares e pancreáticas, favorecendo a acidez. Contudo, observa-se uma diminuição gradual da acidez do duodeno até ao íleo (Madigan *et al.*, 2006). É na transição íleo – cego que se verifica um grande número de microrganismos devido ao aumento da alcalinidade. O intestino delgado é colonizado com uma diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e parasitas, sendo os géneros bacterianos *Lactobacillus* e *Enterococcus* os mais predominantes neste local (Brooks *et al.*, 2004; Murray, 2005).

É no intestino grosso, mais propriamente no cólon, que estão presentes a maioria dos microrganismos existentes no intestino. Isto deve-se ao facto de ser o local privilegiado para ocorrer a fermentação usando, os microrganismos, nutrientes provenientes da digestão dos alimentos (Madigan *et al.*, 2006).

Na flora intestinal dos adultos predominam os filos Firmicutes (64%) e Bacteroidetes (23%). Os filos presentes em menor percentagem são Proteobacteria e Actinobacteria (Madigan *et al.*, 2006). Embora estes organismos estejam presentes na maioria dos indivíduos, há sempre variações nas proporções existentes e nas espécies presentes (Madigan *et al.*, 2006).

Anaeróbios facultativos (por exemplo *Escherichiacoli*, *Proteus spp.*) e aeróbios estritos (por exemplo *Pseudomonas spp.*) estão presentes no intestino grosso mas em menor número do que os anaeróbios estritos, representando cerca de 1 – 4% da flora intestinal. Os anaeróbios facultativos consomem todo o oxigénio, levando ao aparecimento de anaeróbios. Géneros como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* e *Peptostreptococcus* são exemplos de anaeróbios e representam entre

96% a 99% da flora intestinal humana normal, mais precisamente do cólon (Brooks *et al.*, 2004; Madigan *et al.*, 2006; Murray, 2005).

Em minoria, estão também presentes organismos do domínio *Archaea*, representado pela espécie *Methanobrevibacter smithii*, leveduras e alguns protistas (Figura 1) (Madigan *et al.*, 2006).

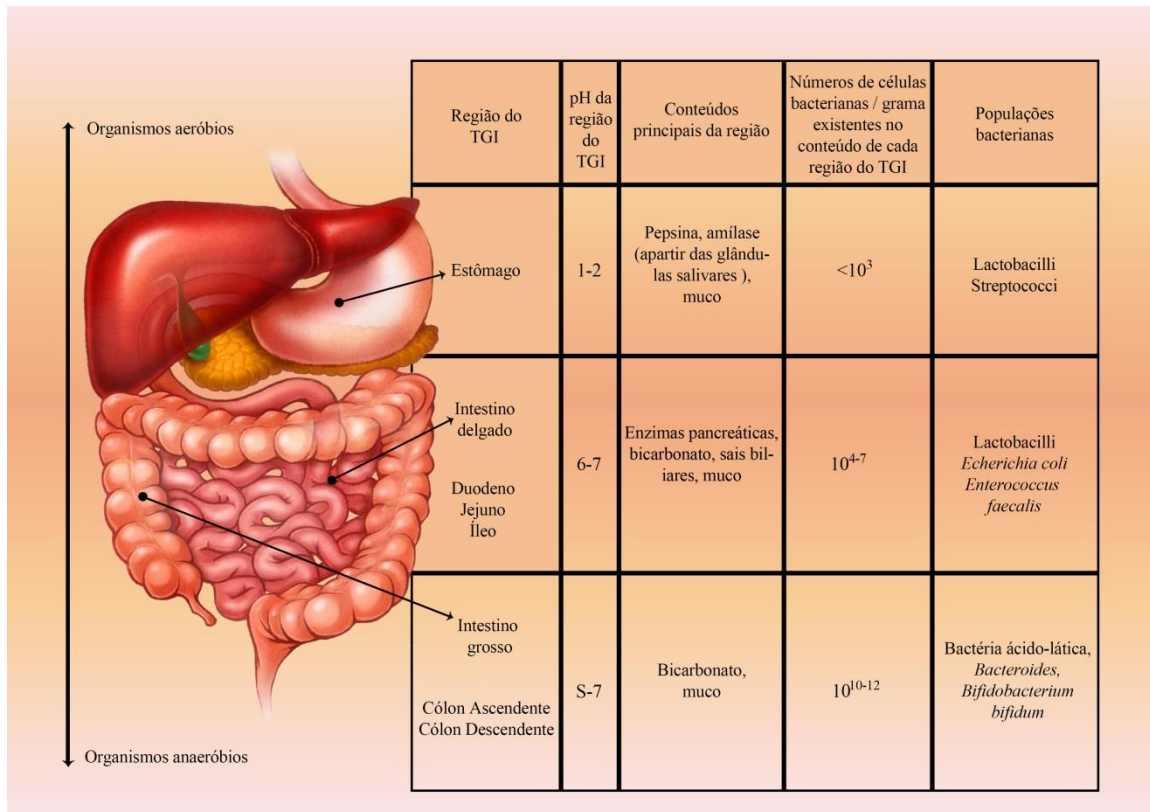


Figura 1. Composição e concentrações de espécies microbianas dominantes em diferentes regiões do trato gastrointestinal (adaptado de Prakash, 2011b).

2.2. Desenvolvimento do microbiota intestinal

O desenvolvimento inicial do microbioma humano começa após o nascimento de um bebê, sendo este estéril durante a gestação (Talaro, 2008).

Algumas horas após o parto inicia-se a colonização. O tipo de parto influencia a colonização microbiana dos recém-nascidos. Em caso de parto normal, o recém-nascido passa pela vagina, ficando em contacto com os microrganismos que fazem parte da flora

vaginal da mãe, ocorrendo a colonização por *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus* (Biasucci *et al.*, 2008; Penders *et al.*, 2006).

A colonização do trato gastrointestinal ocorre de forma contínua e progressiva ao longo do tempo. Isto acontece devido ao contacto do recém-nascido com os familiares e profissionais de saúde e à alimentação (Talaro, 2008).

A amamentação é outro fator que influencia o tipo de colonização intestinal. Há recém-nascidos cuja alimentação não é o leite materno mas sim fórmula infantil para lactentes. Neste caso, o tipo de população intestinal que se observa é composta por géneros de *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Na alimentação à base de leite materno, o principal género é *Bifidobacterium* e permite a metabolização de açúcares em ácidos, conferindo assim proteção contra patogénios intestinais. Os fatores referidos anteriormente têm um impacto preponderante na evolução do microbioma intestinal (Talaro, 2008).

Durante a infância, a diversidade tende a aumentar e a composição a modificar de forma extremamente rápida, pois ocorre o desmame e sucede-se a introdução de alimentos sólidos. Os microrganismos a que a criança vai estar exposta são importantes para a maturação da flora. Apesar da constante mudança da composição do microbiota intestinal durante a infância, verifica-se uma estabilização na idade adulta (Figura 2) (Fiocchi e Pereira de Sousa, 2012).

A variação na composição e função do microbiota durante a infância, poderá trazer consequências na idade adulta, nomeadamente no estado de saúde (Mariat *et al.*, 2009).

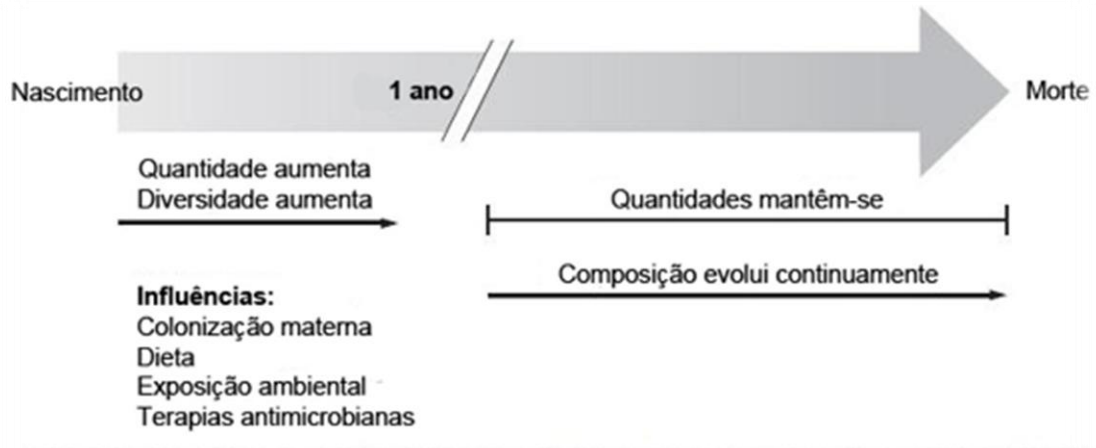


Figura 2. Representação da alteração do microbiota intestinal ao longo do tempo (adaptado de Serikov, 2010).

2.3. Métodos de sequenciação e análise para pesquisa do microbioma e microbiota intestinal

Os estudos que envolvem o microbioma e o microbiota têm vindo a suscitar grande interesse na comunidade científica. Apesar da identificação de microrganismos ainda ser feita recorrendo a métodos dependentes de cultura e isolamento das colónias dos microrganismos presentes (Morgan e Huttenhower, 2012), o desenvolvimento de técnicas inovadoras de biologia molecular foi fundamental para este estudo (Madigan *et al.*, 2006). De facto, o principal problema das técnicas tradicionais de cultura microbiológica é o facto de não permitem detetar determinados microrganismos devido ao facto de serem nutricionalmente muito exigentes, o que torna o seu crescimento difícil por estes meios (Morgan e Huttenhower, 2012).

Novas técnicas como, por exemplo, a hibridização por FISH (fluorescent in situ hybridization), em que se utiliza oligonucleótidos complementares a determinada sequência de DNA da população microbiana e PCR (utilizando sequências de genes 16S rRNA), foram usadas durante muitos anos para identificação de bactérias e ainda hoje funcionam como referência para essa identificação (Morgan e Huttenhower, 2012).

Com o progresso científico e de tecnologias de sequenciação, surgiu o *Next-Generation Sequencing* (NGS). Este tem por base a sequenciação total de um genoma

de forma mais acelerada, obtendo os resultados em menos de um dia e de forma mais económica quando comparada com métodos convencionais, como a sequenciação de Sanger. A Roche/454 GS, Illumina/Solexa, Helicos BioSciences são exemplos de tecnologias de *Next-Generation Sequencing* (Nayarisseri *et al.*, 2013; Padmanabhan *et al.*, 2013; Scholz *et al.*, 2012). Assim, surgiu a metagenómica, a qual tem como princípio a análise de genomas de comunidades microbianas de um determinado ambiente (microbioma intestinal, por exemplo), por técnicas independentes de cultura (a técnica exercida é o isolamento e sequenciação do DNA diretamente desse ambiente (Padmanabhan *et al.*, 2013; Scholz *et al.*, 2012; Turnbaugh e Gordon, 2009). Estas tecnologias tornaram possível o avanço no estudo do microbioma e, consequentemente, da classificação e caracterização do microbiota (Singh *et al.*, 2008).

Para complementar a metagenómica, existem outros estudos como a metatranscriptómica, a metaproteómica e a metametabolómica. A metatranscriptómica reconhece quais são os genes que estão ou não a ser expressos num ambiente e consegue monitorizar as alterações que ocorrem na sua transcrição (Lim *et al.*, 2013). A metaproteómica possibilita uma caracterização melhorada do funcionamento de proteínas ou péptidos para melhor compreensão da comunidade microbiana. Por fim, a metametabolómica permite analisar os metabolitos que são produtos finais de processos químicos ou celulares e, assim, proporcionar uma explicação próxima da fisiologia do organismo (Morgan e Huttenhower, 2012).

A análise metagenómica é considerada uma alavanca no que diz respeito ao conhecimento de novos microrganismos e levou à construção de bibliotecas metagenómicas. Estas bibliotecas exibem o material genético de cada um dos microrganismos presentes na amostra, que são determinados por técnicas de sequenciação de DNA. Estas bibliotecas metagenómicas são sujeitas a uma triagem que tem como objetivos a deteção de novos genes funcionais, compreender a dinâmica da comunidade de microrganismos com o hospedeiro (Homem) e identificar a diversidade da microbiota (CanadianMetaMicroBiomeLibrary, 2014; Daniel, 2004).

Paralelamente às técnicas referidas, a bioinformática é também muito utilizada pois permite organizar e relacionar a informação biológica recolhida (Singh *et al.*, 2008). O conhecimento e compreensão do genoma humano e também do genoma dos microrganismos que nele habitam, principalmente no intestino, através dos métodos

referidos e dos futuros métodos desenvolvidos, levam e/ou podem levar a processos mais eficazes de diagnóstico, terapêutica e prevenção de patologias, com base em comparação entre microbiota de indivíduos saudáveis e doentes (Zarowiecki, 2012). Assim, a análise do microbiota pode vir a fazer parte do cotidiano na prática clínica (Weinstock, 2012).

2.4. Fatores que afetam a composição do microbiota intestinal

Os diversos locais do organismo constituídos por flora comensal tendem a sofrer alterações na composição dos microrganismos e o microbiota intestinal não será exceção (Sommer e Bäckhed, 2013). Estas alterações devem-se tanto a fatores ambientais, como variações na idade, dieta, estilo de vida do hospedeiro, higiene e terapêutica com antibióticos (Sommer e Bäckhed, 2013).

Nos jovens adultos verifica-se um predomínio do filo Firmicutes comparativamente aos filis Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria. Com o avançar da idade, tende a observar-se uma prevalência superior de Bacteroidetes, porém o número de espécies e diversidade, dentro deste filo, diminui (Mariat *et al.*, 2009). Esta alteração na microbiota pode ser devida ao aumento da necessidade de digerir a alimentação, com o objectivo de compensar a diminuição da funcionalidade do sistema digestivo (Mariat *et al.*, 2009).

Embora se verifique a prevalência do filo Bacteroidetes nos indivíduos idosos deve ter-se em conta a existência de uma variabilidade inter-individual, mesmo quando, em estudos, se dispõe os idosos de acordo com o seu estado de saúde (Brüssow, 2013).

O microbiota intestinal é importante para a fermentação de polissacarídeos provenientes da dieta. Por sua vez a dieta pode afetar a composição do microbiota bem como a sua atividade. Um exemplo desta situação, ocorre quando o indivíduo tem uma dieta rica em fibras que, posteriormente, leva ao aumento de substratos fermentáveis no intestino e da velocidade de trânsito intestinal. Assim, o trânsito intestinal acelerado leva a que microrganismos de crescimento rápido se sobreponham aos de crescimento lento. O aumento de ácidos gordos de cadeia curta, resultantes da fermentação, leva à

diminuição do pH no lúmen intestinal resultando no aumento de microrganismos pertencente são filo Firmicutes (Salonen e Vos, 2014).

Dieta com alto teor em gorduras estimulam a produção da bÍlis, a qual vai afetar a composição do microbiota tanto na diversidade como na quantidade uma vez que a bÍlis tem efeito bactericida (Salonen e Vos, 2014).

O impacto da dieta no microbiota intestinal pode ser estimado pela forma como alterações alimentares a curto prazo influenciam a composição do microbiota. Segundo um estudo, verificou-se que indivíduos sujeitos, por um curto período de tempo, a uma dieta diferente da habitual, apresentavam já alterações na composição e actividade do microbiota intestinal ao fim de três dias (David *et al.*, 2014).

O microbiota intestinal é influenciado por diversas particularidades do estilo de vida moderno. Estas particularidades passam pela melhoria do saneamento básico, urbanização, uso excessivo de antibióticos, menor exposição a infeções na infância, vacinação, sedentarismo, entre outros (Bernstein e Shanahan, 2008).

A higiene, que está também relacionada com a melhoria do saneamento básico, é um fator ambiental que pode contribuir para a alteração do microbiota intestinal. Pensa-se que a exposição escassa a microrganismos, sejam eles benéficos (simbiontes) ou prejudiciais (patogénicos) para o organismo, numa fase inicial da vida e durante esta, possa influenciar o desenvolvimento normal e adequado do sistema imunitário. Isto sustenta a “Hipótese da Higiene”, a qual sugere a ocorrência de uma perda de tolerância imunológica por parte do hospedeiro. O sistema imunitário deste pode reconhecer o microbiota comensal como anormal, desenvolvendo respostas imunitárias agressivas e induzindo a ativação de mecanismos de autoimunidade (Boerner e Sarvetnick, 2011).

O tratamento com antibióticos, embora essencial aquando de uma infeção, pode ter efeitos drásticos no microbiota intestinal, como a eliminação da diversidade e a desregulação do sistema imunitário do hospedeiro, levando a uma maior susceptibilidade à doença. O espectro de ação do antibiótico, a dosagem e o tempo de duração do tratamento, a via pela qual é administrado e também as características relativas ao fármaco e ao organismo (farmacocinéticas e farmacodinâmicas), influenciam a forma como os antibióticos alteram o microbiota intestinal (Jernberg *et al.*, 2010).

Os antibióticos usados no tratamento de doenças são normalmente de espectro alargado, atingindo não só as bactérias responsáveis pela infecção, como também outros microrganismos. Os microrganismos que resistem podem depender de produtos resultantes do metabolismo secundário efetuado pelas bactérias depletadas, o que pode levar à perda de nutrientes e ou acumulação de produtos tóxicos, interferindo com o normal equilíbrio destes microrganismos, podendo também conduzir à sua eliminação (Willing *et al.*, 2011).

Embora na sua maioria as bactérias tenham um poder de resiliência elevado (capacidade que os microrganismos têm em tolerar alterações bruscas no seu estado de equilíbrio), por vezes não se verifica a restauração da totalidade do microbiota, o qual pode ocorrer por um tempo indeterminado (Figura 3) (Lozupone *et al.*, 2012).



Figura 3. Representação de fatores ambientais que afetam a composição do microbiota intestinal (adaptado de Sommer e Bäckhed, 2013).

2.5. Impacto do microbiota na fisiologia do hospedeiro

O microbioma humano tem cerca de 3 milhões de genes no trato gastrointestinal, o que corresponde a 150 vezes mais do que o genoma humano. A combinação de células e genes bacterianos com células e genes do hospedeiro levam à conceção de um “superorganismo”. Este depende das interações apropriadas entre o microbiota intestinal e o hospedeiro para alcançar e manter a saúde (Sommer e Bäckhed, 2013).

A interação do microbiota intestinal com o hospedeiro permite, além de um conjunto de atividades metabólicas diversificadas, complementar a fisiologia do hospedeiro. A fisiologia passa pelo desenvolvimento e morfogénese de órgãos e tecidos.

Alguns estudos demonstraram que a maturação do trato gastrointestinal está estritamente relacionada com o microbiota. Após o nascimento, o trato gastrointestinal encontra-se estrutural e funcionalmente imaturo. Com a colonização e posterior alteração da dieta (desmame), verifica-se uma alteração na composição do microbiota e, consequentemente, da maturação intestinal (Sommer e Bäckhed, 2013).

Um estudo comparativo entre ratinhos colonizados e ratinhos *germfree* (isentos de bactérias) demonstrou que os últimos apresentavam bordaduras em escova menos desenvolvidas e uma reduzida espessura das vilosidades intestinais, quando comparado com os ratinhos colonizados (Reinhardt *et al.*, 2012).

A colonização de ratinhos *germfree* permitiu remodelar as vilosidades intestinais, tornando-as mais curtas e espessas e, desta forma, impedir a passagem dos microrganismos. Esta remodelação, posterior à colonização, foi associada à glicosilação do fator tecidual (TF) que é uma mistura de lipoproteínas libertadas pelos tecidos (Seeley *et al.*, 2003a), que tem por consequência a ativação de uma cascata de reações com a finalidade de promover a angiogénese (Reinhardt *et al.*, 2012).

Segundo outros estudos, ratinhos *germfree* apresentavam reduzida reestruturação celular ao nível do epitélio, bem como uma reduzida indução da apoptose (Crawford e Gordon, 2005). Este facto leva a crer que o microbiota intestinal tem a capacidade de regular a homeostasia de órgãos e tecidos. Sendo assim, o equilíbrio será essencial, caso contrário poderá induzir patologias como cancro. Quando o indivíduo tem cancro, verifica-se que há um número elevado de bactérias no intestino, aquando da realização da biopsia (Mueller *et al.*, 2012; Swidsinsk *et al.*, 1998).

O microbiota intestinal é também importante na homeostasia de outros tecidos, nomeadamente o osso. Nos ratinhos *germfree* verificou-se uma maior densidade mineral óssea quando comparados com os ratinhos colonizados, devido ao número reduzido de recetores de serotonina nas células ósseas, e às citocinas pro-inflamatórias diminuídas. Aquando a colonização de ratinhos *germfree* com o microbiota intestinal, verificou-se a

normalização da massa óssea demonstrando que o microbiota intestinal regula a massa óssea (Sjögren *et al.*, 2012; Sommer e Bäckhed, 2013).

A serotonina tem como efeito inibir a formação do osso, enquanto as citocinas (Tumor Necrosis Factor -TNF e Interleucina-1 β - IL-1 β) levam à osteoclastogênese. Isto reforça a ideia de que a modulação das células T pela ação do microbiota, os níveis de serotonina e o perfil de citocinas podem contribuir para a modulação da homeostasia óssea (Sommer e Bäckhed, 2013).

2.6. Microbiota e sistema imunológico intestinal

O constante dinamismo do intestino humano inclui interações ativas e variáveis entre o microbiota e o hospedeiro. No entanto, as constantes oscilações na composição do microbiota, em conjunto com o grande número de células bacterianas e a sua elevada proximidade com o tecido epitelial, constituem um enorme desafio à imunidade do hospedeiro (Sommer e Bäckhed, 2013).

O sistema imunológico (SI) é composto por órgãos linfóides, estruturas onde as células envolvidas na imunidade se desenvolvem, proliferam e são capazes de realizar as suas funções. O conjunto destas estruturas designa-se Sistema Linfóide. Os órgãos linfóides são classificados em primários, onde estão incluídos o timo e medula óssea, e secundários, como o baço, nódulos linfáticos, os MALT e os GALT. O MALT e o GALT são tecidos linfóides associados à mucosa e à musculosa do intestino, respectivamente (Seeley *et al.*, 2003b; Willey *et al.*, 2009).

Apesar de representar um desafio à imunidade, o microbiota intestinal desempenha um papel importante no desenvolvimento e na expansão dos tecidos linfóides e na manutenção e regulação da imunidade intestinal (Sommer e Bäckhed, 2013).

Durante a vida fetal, as células indutoras do tecido linfóide (LTi-células) são responsáveis pelo desenvolvimento do GALT, onde se incluem as Placas de Peyer (PP) e os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM). Após o nascimento, ocorre a maturação do GALT, uma vez que o recém-nascido começa a ser colonizado, sendo que a maturação depende da colonização microbiana. Esta ação é sugerida por estudos realizados em

ratinhos *germfree*. Nestes estudos, verificou-se que a mucosa intestinal dos ratinhos *germfree* apresentava um menor número de células B, T e células dendríticas e uma imaturidade nos NLM, sendo as PP pequenas e imaturas. Relativamente às vilosidades, estas apresentavam-se alongadas e estreitas, a rede vascular menos desenvolvida e a profundidade das criptas intestinais era menor. Aquando da colonização destes animais por microrganismos comensais, verificou-se o desenvolvimento de todas as estruturas associadas ao sistema imunológico, fundamental para proteção do hospedeiro (Figura 4) (Sommer e Bäckhed, 2013).

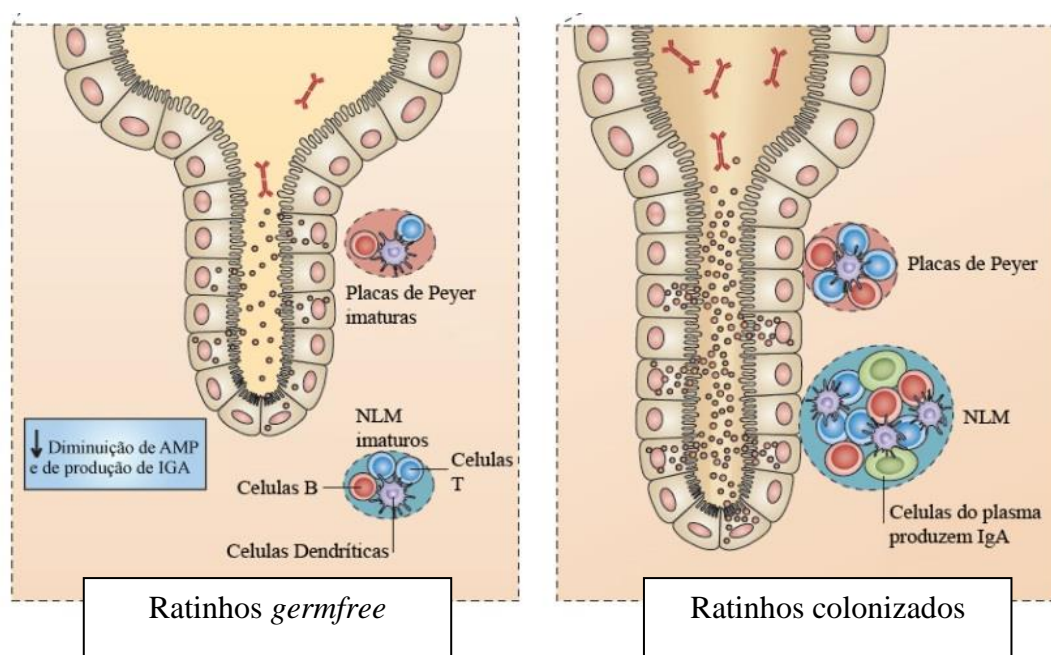


Figura 4. Representação do desenvolvimento imunológico induzido pelo microbiota intestinal (adaptado de Sommer e Bäckhed, 2013).

Os componentes celulares imunitários estão distribuídos ao longo do intestino nas PP, NLM, lâmina própria e epitélio. O sistema imunitário é composto pela relação complexa e coesa entre a imunidade inata e a adaptativa. A imunidade inata tem como característica uma resposta rápida a uma grande variedade de estímulos, através da ação de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CD) e células *Natural Killer* (NK), (Cruvinel *et al.*, 2010).

À superfície dos microrganismos é comum encontrar compostos como lipopolissacarídeos (LPS), resíduos de manose e ácidos teicoicos. Estes consistem em Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) que vão ativar a resposta imune

inata. Recetores como os Toll-like (TLRs) são conhecidos por serem Recetores de Reconhecimento de Padrões (PRR) da microbiota comensal e permitem o reconhecimento de antígenos PAMP. Estes recetores estão presentes em macrófagos, neutrófilos e CD (Cruvinel *et al.*, 2010; Thais *et al.*, 2014).

As PP são agregados linfóides, com células B, T, células dendríticas e macrófagos. As células M (*microfold cells*, isto é, células com micropregas) encontram-se no epitélio intestinal e permitem a passagem de alguns microrganismos, realizando uma função de amostragem. Logo abaixo das células M, encontra-se uma região rica em células B, T e CD. As CDs migram até as células M, adquirem o antígeno e apresentam-no às células T naïve. Estas podem posteriormente migrar para outros locais, como NLM ou lâmina própria, produzindo mediadores e iniciando a resposta imune adaptativa (Magrone e Jirillo, 2013).

As células apresentadoras de antígenos são importantes na indução da resposta imune adaptativa por intermédio dos linfócitos. Numa situação normal, as CDs e os macrófagos têm a função de capturar e apresentar os antígenos às células T reguladoras (Treg), que são responsáveis pelo desenvolvimento de mecanismos de tolerância (Cruvinel *et al.*, 2010). Estas são responsáveis pela ativação de linfócitos B, levando à produção de imunoglobulina A (IgA). A PP é o principal local de produção de IgA. A IgA é secretada para o lúmen intestinal e, através de ligações aos antígenos microbianos, previne a entrada destes através do epitélio intestinal evitando, assim, a ocorrência de infeções (Bernardo, 2013; Sommer e Bäckhed, 2013).

A indução de tolerância imunológica no intestino é fundamental para evitar respostas inflamatórias indesejáveis contra proteínas alimentares, ou contra o próprio microbiota intestinal. As células T podem gerar subpopulações cuja resposta imunológica é pro-inflamatória ou anti-inflamatória. As células Th1, Th2 e Th17 – células *Helper*, são de carácter pró-inflamatório enquanto as células Treg (de fenótipo CD4⁺ CD25⁺) são anti-inflamatórias. A bactéria gram-negativa *Bacteroides fragilis*, presente num intestino normal, induz a diferenciação de células T CD4⁺ em células Treg, levando à produção de citocinas anti-inflamatórias como interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento beta (TGFβ), anulando a resposta pró-inflamatória da Th17 (Sommer e Bäckhed, 2013). A cápsula desta bactéria é constituída por polissacarídeo A (PSA) (Cerf-Bensussan e Gaboriau-Routhiau, 2010). A

diferenciação de células Treg depende do reconhecimento pelas células T CD4⁺, do PSA apresentado pelas CDs (Sommer e Bäckhed, 2013). Por sua vez, bactérias segmentadas filamentosas (BSF), após contacto com células apresentadoras de antígeno, demonstraram induzir células pró-inflamatórias, como as células Th17.

Contudo, apesar de se considerar que a indução da inflamação é um inconveniente, também pode ser benéfica, se controlada. As respostas imunológicas desencadeadas pelo microbiota parecem contribuir para reforçar a barreira intestinal.

Esta hipótese é sustentada por um estudo em ratinhos cujo microbiota não inclui BSF, os quais apresentam respostas imunológicas mais frágeis. Também se observou que estes ratinhos não conseguiram evitar a infeção por agentes invasores, como por exemplo *Citrobacter rodentium*, em consequência da função de barreira intestinal debilitada (Cerf-Bensussan e Gaboriau-Routhiau, 2010).

2.7. Microbiota e metabolismo

O microbiota intestinal contribui para a metabolização de nutrientes e vitaminas essenciais para a viabilidade do hospedeiro, contribuindo para a obtenção de energia a partir dos alimentos (Tremaroli e Bäckhed, 2012).

A obtenção de energia a partir da dieta é uma função metabólica importante, uma vez que as células e, conseqüentemente, também todo o organismo humano, precisam de energia para se manterem vivas. Embora o intestino produza as enzimas que degradam os hidratos de carbono, estas enzimas não conseguem degradar os hidratos de carbono complexos. Assim, estes compostos sofrem fermentação pelos microrganismos comensais do intestino obtendo-se oligossacáridos e monossacáridos e, a partir destes, ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) (Tremaroli e Bäckhed, 2012). Um estudo que comparou ratos *germfree* e ratos colonizados com microbiota comensal, alimentados com a mesma quantidade demonstrou que os ratos *germfree* apresentavam uma maior excreção de calorias por via renal e fecal e uma redução dos níveis de AGCC e de gordura, comparativamente aos ratos colonizados com microbiota comensal. Contudo, verificou-se que, quando colonizados com microbiota comensal, os ratos *germfree* apresentavam parâmetros normais (Meireles, 2012; Rodrigues, 2011).

Os AGCC são fonte de energia sendo o acetato, o propionato e o butirato produzidos em maior quantidade. Estes são absorvidos no colón, onde cada um destes tem uma função específica. O butirato funciona como substrato energético do metabolismo celular do epitélio do cólon, enquanto os restantes vão para o fígado e servem de substratos na gliconeogénese e lipogénese, fundamentais para a formação de glucose e ácidos gordos, respetivamente (Scott *et al.*, 2013). Os AGCC possuem também capacidade de se ligarem aos recetores acoplados a proteína G (GPCRs). Este processo é importante na expressão do péptido yy (Pyy) e na produção de *Glucagon-Like peptide-1* (GLP-1). O Pyy é responsável pela redução do apetite enquanto o GLP-1 estimula a secreção de insulina, apresentando assim um efeito antidiabético (Lim e Brubaker, 2006).

É também importante realçar o metabolismo dos ácidos biliares proveniente do colesterol da dieta. O fígado sintetiza ácidos biliares primários a partir de colesterol, os quais sofrem alteração por parte do microbiota intestinal convertendo-se em ácidos biliares secundários. No intestino, os ácidos biliares promovem a absorção das gorduras da dieta e das vitaminas lipo-solúveis. Os ácidos biliares primários ligam-se a recetores celulares como o FXR (*Farnesoid X receptor*), um recetor nuclear que funciona como fator de transcrição induzindo a conjugação, transporte e excreção de ácidos biliares (Claudel *et al.*, 2005). Os ácidos biliares secundários ligam-se a recetores celulares como TGR5 (*G protein-coupled receptor*). Estes, após serem ativados, desencadeiam diversos efeitos metabólicos protetores, nomeadamente resistência tanto ao aumento de peso, como ao desenvolvimento de esteatose hepática. Tais efeitos podem dever-se à potenciação da função mitocondrial a nível muscular, no tecido adiposo castanho e nas células enteroendócrinas, levando a um aumento do consumo energético e secreção, por exemplo, de GLP-1. Deste modo verifica-se uma melhoria da função pancreática, por estimulação das células β , e um aumento da tolerância a glucose (Doyle e Egan, 2007; Thomas *et al.*, 2009).

A relação entre microbiota e metabolismo tem vindo a revelar bastante interesse clínico devido à possível relação com diversas patologias (Tremaroli e Bäckhed, 2012).

III. Patologias associadas à composição do microbiota intestinal

3.1. Obesidade e Resistência à Insulina

A obesidade, cuja prevalência tem vindo aumentar nos últimos anos, está associada ao desenvolvimento de certas patologias, como a diabetes. A obesidade é definida como uma acumulação anormal ou excessiva de gordura. A resistência à insulina ou reduzida sensibilidade à insulina é caracterizada pelo facto de ela não entrar nas células e ficar na corrente sanguínea e apresenta uma forte relação com a obesidade (Direção-Geral da Saúde, 2005; World Health Organization, 2014c).

O microbiota intestinal do hospedeiro contribui diretamente para a obtenção de energia, podendo assim estar relacionado com a obesidade e resistência à insulina (Musso *et al.*, 2010).

A leptina é uma hormona produzida pelos adipócitos, cuja síntese é controlada pelo cérebro e cuja função é a redução do apetite e peso corporal. Verificou-se que em ratinhos *ob/ob* (com mutação no gene que codifica para a leptina), havia um aumento do apetite e uma alteração na composição do microbiota intestinal. A percentagem de organismos do filo Firmicutes era maior em comparação com o filo Bacteroidetes. Em casos de obesidade verifica-se que os níveis plasmáticos de leptina se encontram aumentados, sugerindo uma situação de resistência à leptina (Lee *et al.*, 2001; Myers Jr *et al.*, 2010).

A resistência à insulina está relacionada com a inflamação. As bactérias que compõem o microbiota intestinal possuem LPS e peptidoglicanos na sua parede. Ambas as moléculas podem induzir inflamação, ligando-se a PRR na membrana de células. A ligação de LPS a receptores como o CD14 e TLR4, conduz à libertação de citocinas pró-inflamatórias, por parte dos macrófagos, adipócitos e fígado, tendo sido observado um aumento dessa produção em casos de resistência à insulina. De facto, em indivíduos com diabetes tipo 2, observou-se uma elevação dos níveis plasmáticos de LPS, o que propõe que o microbiota intestinal possa afetar o metabolismo do hospedeiro através da promoção de inflamação crónica do tecido adiposo. Num estudo, foi demonstrado que ratinhos *germfree ob/ob* ou ratinhos *ob/ob* tratados com antibióticos contra bactérias de gram-negativo não manifestam resistência à insulina, ou outras desordens metabólicas. Ratinhos *ob/ob* tratados com inibidor de LPS regrediram a inflamação e as desordens

associadas, contrariamente a ratinhos ob/ob não sujeitos à inibição do LPS (Kim e Sears, 2010; Membrez *et al.*, 2008).

Os peptidoglicanos podem induzir a inflamação através da ligação a recetores do tipo NOD-1 (*Nucleotide-binding oligomerization domain - 1*), presentes em fagócitos e outras células do sistema imunitário. Esta ligação dá início à ativação de cascatas de sinalização intracelular, que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias. Isto conduz a diminuição da sensibilidade à insulina (Zhou *et al.*, 2012).

Relativamente à obesidade, um estudo teve como objetivo avaliar de que forma a introdução do microbiota de ratinhos de linhagem ob/ob e ratos *lean* (sem mutação no gene ob/ob) em ratinhos *germfree* influenciava a obtenção de energia a partir da dieta. Assim, verificaram que os *germfree*, que receberam o microbiota dos ratinhos de linhagem ob/ob, tiveram um aumento da deposição de gordura e, conseqüentemente, de peso corporal. Observou-se então que o microbiota intestinal tem influência na obtenção de energia e na massa corporal. (Turnbaugh *et al.*, 2006).

3.2. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DC) são caracterizadas por problemas ao nível do coração e vasos sanguíneos. As DC podem ser provocadas por várias patologias entre as quais está a aterosclerose. Esta é caracterizada pela acumulação de placas de gordura que podem bloquear a passagem total ou parcial do sangue (World Health Organization, 2014a).

O microbiota intestinal pode estar relacionada com DC e isto, devido a interferência com o metabolismo da colina. A colina é um constituinte das membranas celulares e pode ser obtida através da dieta, ou sintetizada pelo hospedeiro. No intestino a colina é metabolizada pelo microbiota em trimetilamina (TMA) que, por sua vez é metabolizada pelo fígado em trimetilamina-N-óxido (TMAO). Este composto é considerado prejudicial, contribuindo para o aparecimento de doenças cardiovasculares, nomeadamente a aterosclerose, tal como esquematizada na figura 5. Este facto é suportado por estudos em animais propensos a desenvolver aterosclerose e demonstram que o tratamento com antibióticos conduz a redução da flora intestinal, responsável pela

metabolização da colina e, conseqüentemente, a diminuição da aterosclerose (Howitt e Garrett, 2012; Wang *et al.*, 2011).

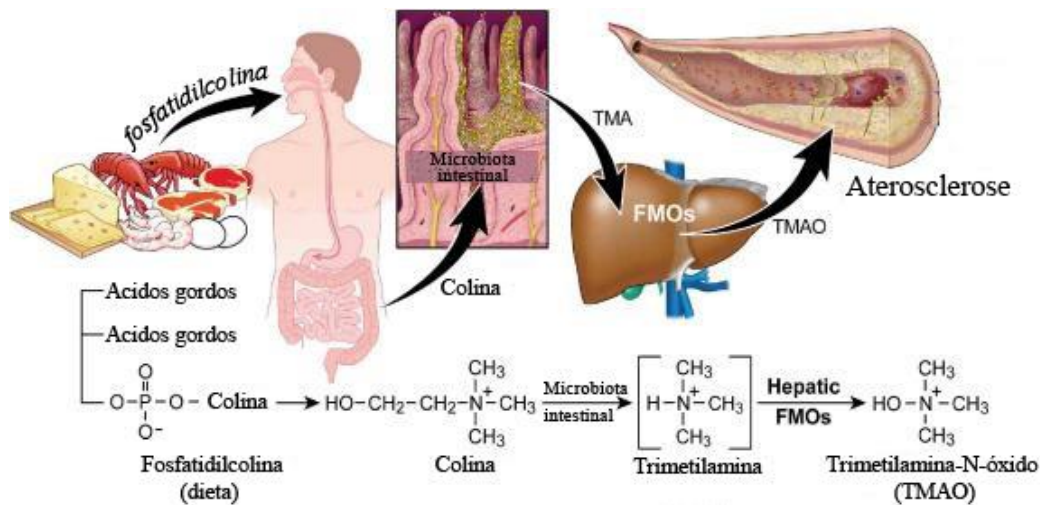


Figura 5. Representação do metabolismo da colina (Wang *et al.*, 2011).

3.3. Diabetes tipo 1

A diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é um exemplo de uma doença auto-imune onde ocorre a destruição das células beta pancreáticas. Os indivíduos que sofrem esta patologia são insulina-dependentes. Normalmente, esta doença é diagnosticada logo na infância, mas pode desenvolver-se em qualquer idade (World Health Organization, 2014b).

Esta patologia pode advir de causas como a alteração da diversidade microbiana no intestino, o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, a inflamação intestinal e respostas imunes inadequadas por parte da mucosa intestinal (Vaarala *et al.*, 2008). Para além destas causas, a “Hipótese da Higiene” também pode estar relacionada com DM1, uma vez que esta sugere que a não exposição ao sistema imunitário de antígenos microbianos na infância, pode levar a uma resposta exagerada por parte do sistema imune e conseqüente destruição de células pancreáticas (Rook, 2010).

Aos recetores TLR ligam-se proteínas como MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 8*), um adaptador que se liga a vários recetores da imunidade inata e que reconhecem estímulos de microrganismos. Um estudo demonstrou que ratos

specific pathogen-free NOD (*non-obese diabetic*), que não possuem a proteína MyD88, não desenvolvem DM1, um fenómeno dependente do microbiota intestinal, dado que ratos *germfree* NOD também não possuidores de proteína MyD88 desenvolvem diabetes. A colonização destes ratos *germfree* NOD leva a um grau de diabetes atenuado (Prakash *et al.*, 2011a).

Outro estudo evidenciou que os ratos *biobreeding* (BB) (modelo de ratos mais usado para estudar a DM1), propensos à diabetes (BB-DP, têm mutação no gene *Ian4* que leva a uma deficiência de células T) e resistentes à diabetes (BB-DR, possuem fenótipo imunológico normal) (Adamczak *et al.*, 2014) diferiam no tipo de microbiota intestinal, dado que estes últimos tinham maior número de microrganismos de carácter probiótico, tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Isto leva a pensar que o microbiota intestinal está relacionado com doença (Roesch *et al.*, 2009).

3.4. Doença inflamatória intestinal

A doença inflamatória intestinal (DII) como o próprio nome indica é caracterizada por um estado inflamatório no intestino. A colite ulcerosa e a doença de Crohn são exemplos de DII, cada com um desenvolvimento e tratamento diferente (Abraham e Cho, 2009).

A doença de Crohn é descrita por um processo inflamatório crónico, que afeta mais frequentemente a porção final do intestino delgado, o íleo e ou o intestino grosso, como o colón e reto. Por outro lado, a colite ulcerosa está associada à inflamação crónica da mucosa que reveste o intestino grosso. As causas que levam à doença de Crohn e à colite ulcerosa não são ainda bem conhecidas, embora as investigações apontem como possíveis causas uma disfunção do sistema imunitário, algumas bactérias do microbiota intestinal, a dieta alimentar e também a genética (Abraham e Cho, 2009; Baumgart e Carding, 2007; Baumgart e Sandborn, 2012).

A doença de Crohn parece estar relacionada com espécies do microbiota especificamente a *Escherichia coli* aderente-invasiva, segundo estudos realizados. Em pacientes com esta doença verificou-se um aumento desta bactéria nas fezes, nomeadamente quando a doença está ativa. O estudo do microbiota intestinal nestes

doentes, demonstrou um número exacerbado de *Escherichia coli* aderente-invasiva tanto nas lesões iniciais como em estado crónico em comparação com os controles assintomáticos (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Willing *et al.*, 2009).

Por outro lado verifica-se uma redução do número de microrganismos dos filos Bacteroidetes e Firmicutes. A alteração na diversidade por si só não é a causa da doença de Crohn, é necessário um genótiposusceptível, o que acontece, por exemplo, quando há a presença de determinadas mutações (Baumgart e Sandborn, 2012; Boerner e Sarvetnick, 2011).

Uma mutação no gene que codifica para a proteína NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain - 2*) em pacientes portadores da doença de Crohn, evidenciou uma relação entre deficiências na resposta imunológica inata a bactérias invasivas e o desenvolvimento da doença em questão (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Quanto à colite ulcerosa, como é uma inflamação que ocorre mais a nível da mucosa, pensa-se que alterações no muco do intestino poderá ser a sua causa (Fiocchi, 1998).

O muco intestinal é maioritariamente constituído por mucinas e tem uma função protetora do epitélio intestinal, formando uma barreira e seletivamente impedindo a colonização por bactérias do lúmen. A seletividade da acção do muco intestinal deve-se às suas propriedades, que permitem a adesão bacteriana através de determinados componentes (lectinas e glicosidasas), os quais apenas estão presentes em bactérias específicas. Um estudo demonstrou que ratinhos deficientes em mucinas ou com ausência de glicosiltransferases específicas apresentavam um crescimento bacteriano excessivo e se mostraram passíveis de desenvolver colites (Fiocchi, 1998; Sommer e Bäckhed, 2013).

3.5. Doenças neurológicas

O mutualismo que se estabelece entre o microbiota e o hospedeiro pode afetar o desenvolvimento do sistema neurológico e este pode, por sua vez, influenciar a função intestinal. Surge assim um termo designado de eixo cérebro-intestino-microbiota, mostrando uma conexão complexa entre os demais sistemas, com a finalidade de manter o equilíbrio do organismo (Moloney *et al.*, 2014).

A infância e a adolescência são consideradas fases críticas, dado coincidirem tanto com o desenvolvimento do microbiota intestinal, como com o desenvolvimento neurológico. A relação conjunta entre o microbiota e o SNC pode interferir com a resposta ao stress, a percepção da dor, a neuroquímica e no eixo intestino-cérebro levando a disfunções variadas. Transtornos verificados durante estes períodos podem prejudicar o desenvolvimento neurológico, e conseqüentemente induzir desordens mentais, podendo manifestar-se apenas mais tardiamente na vida (Borre *et al.*, 2014).

Pensa-se que a separação materna precoce, considerada um fator ambiental, pode levar a distúrbios neurológicos, tais como ansiedade e depressão (Borre *et al.*, 2014). De facto, um estudo em ratinhos adultos submetidos precocemente à separação materna apontou uma menor intensidade dos sintomas depressivos, quando submetidos a uma terapêutica com um probiótico, neste caso *Bifidobacterium infantism* (Foster e Neufeld, 2013).

Pensa-se também, que o microbiota intestinal esteja relacionado com os níveis plasmáticos de serotonina. Este neurotransmissor, derivado do triptofano, é importante na regulação de estados de humor e por ação no sistema nervoso entérico, interfere na motilidade gastrointestinal (relaxamento e contração do músculo liso), estimulação ou inibição das secreções intestinais, e também responde à dor visceral (McLean *et al.*, 2007). Um estudo em ratinhos *germfree* demonstrou que nestes animais havia níveis elevados de serotonina, tanto plasmáticos como no hipocampo, insinuando que existe uma conexão entre o sistema humoral e a comunicação do microbiota intestinal com o sistema nervoso central. Variações no sistema serotoninérgico acompanham as variações na composição do microbiota intestinal que são frequentes na infância. Contudo, na velhice também se verificam mudanças ao nível do microbiota intestinal o que se pode refletir em alterações na neurotransmissão serotoninérgica. O microbiota intestinal pode ser alvo de manipulação através do uso de pré/próbióticos, na idade adulta, e desta forma mostrar interesse terapêutico para regular o sistema serotoninérgico (O'Mahony *et al.*, 2014).

Está descrito que ratinhos *germfree* podem apresentar défices sociais fortes e aumento de comportamentos repetitivos, semelhantes aos ocorridos em animais autistas. Assim, o microbiota pode ser um fator preponderante para que o indivíduo desenvolva comportamentos sociais corretos, podendo também ser uma causa associada a

perturbações de autismo. Para avaliar se existe uma relação entre microbiota intestinal e outras patologias associadas ao desenvolvimento neurológico como esquizofrenia, déficit de atenção e hiperactividade, outros estudos seriam necessários (Borre *et al.*, 2014).

Por forma a entender a origem de determinadas patologias do foro neurológico e psíquico, bem como prevenir a sua ocorrência, será necessária a realização de mais estudos que impliquem a interação eixo cérebro-intestino-microbiota, nomeadamente em fases da vida mais vulneráveis à instabilidade (Foster e Neufeld, 2013).

IV. Terapia medicamentosa para possível tratamento de patologias associadas a alteração do microbiota intestinal

4.1. Probióticos

O conceito de probiótico foi introduzido pela primeira vez por Elie Metchnikoff em 1907. Mas foi em 2001 que a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura juntamente com a Organização Mundial de Saúde chegaram à definição de probióticos. Estes foram então definidos por “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios á saúde do hospedeiro” (Pineiro e Stanton, 2007).

É importante realçar que os probióticos têm diversos mecanismos de ação, como proteção contra bactérias patogénicas através de competição, produção de compostos antimicrobianos, redução do pH, competição por nutrientes, capacidade imunoestimuladora. Devem ter também determinadas características que lhes permitam sobreviver a passagem pelo sistema digestivo (resistência às enzimas proteolíticas e não conjugação com os sais biliares) e ter capacidade de aderir ao epitélio para posterior colonização (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006; Kechagia *et al.*, 2012; Pineiro e Stanton, 2007).

Cada vez mais o uso de probióticos é aceite pela comunidade científica. Estes são usados para restabelecer ou aumentar a população bacteriana levando a uma melhoria da saúde nomeadamente, da saúde intestinal (Kechagia *et al.*, 2012). Probióticos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais utilizados, uma vez que se observa um balanço positivo fecal quando há um aumento adequado dos níveis fecais destes microrganismos. Estes podem obter-se através da alimentação ou fármacos (Pineiro e Stanton, 2007; Sanders, 2008).

O uso de próbioticos tem demonstrado evidências de eficácia na profilaxia e como adjuvantes de tratamento em determinadas situações clínicas, como obesidade, doença inflamatória intestinal, doenças cardiovasculares, entre outras (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006).

O contributo dos probióticos para o efeito antiobesidade estão ainda um pouco por perceber. Porém, este contributo é sugerido devido à suposição dos efeitos

benéficos do microbiota intestinal na regulação do equilíbrio energético e do controle do peso (Arora *et al.*, 2013).

Estudos em ratinhos obesos demonstraram que a ação antiobesidade poderá dever-se à produção de ácido linoléico conjugado cis-12, trans-10. Esta produção ocorreu quando foram administrados probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum*. Aquando da administração de *L. rhamnosus* observou-se a uma perda de peso corporal, com a diminuição de tecido adiposo, e os níveis plasmáticos de leptina no tecido adiposo encontravam-se diminuídos, assim como a síntese de ácidos gordos de cadeia curta. Quando se administrou a bactéria *Lactobacillus plantarum* verificou-se uma diminuição do peso corporal. Contudo, os níveis plasmáticos leptina não se alteraram de forma significativa. Outro estudo que envolvia a administração da espécie *Lactobacillus casei* Shirota, em ratos obesos, demonstrou que intolerância à insulina foi melhorada enquanto que a intolerância à glucose diminuía (Arora *et al.*, 2013).

Estudos em humanos com excesso de peso demonstraram que com administração de leite fermentado com *Lactobacillus gasseri* ocorreu uma diminuição gordura visceral e subcutânea, o que se pensa que poderá estar ligada à baixa absorção de gordura. O peso corporal e o índice de massa corporal apresentaram uma redução quando equiparados com o grupo controle (Arora *et al.*, 2013).

Os probióticos podem também ser utilizados no tratamento da inflamação crónica observada na DII. Como adjuvantes no tratamentos desta doença estão incluídos probióticos como VSL#3, *Escherichia coli* Nissle 1917 e *Saccharomyces boulardii*. O VSL#3 é uma mistura de oito estirpes de probióticos e parece moderar a inflamação intestinal (Petrof, 2009). Estudos em pacientes com colite ulcerosa leve a moderada apontaram que a administração de quantidades elevadas de VSL#3 ajudaram no tratamento e contribuíram para a remissão da doença, sem grandes efeitos adversos, quando comparado com o grupo placebo (Bibiloni *et al.*, 2005). Quando comparados diferentes tratamentos da doença de Crohn, ou seja, tratamento com *Saccharomyces boulardii* como probiótico ou tratamento com Mesalazina, um anti-inflamatório (grupo controle), demonstraram que o grupo ao qual foi administrado o probiótico exibiu um tempo de remissão aumentado em comparação ao grupo controle (Meijer e Dieleman, 2011).

Outro estudo que implicou a toma de *Escherichia coli* Nissle 1917 evidenciou um tempo de remissão ligeiramente maior em relação ao grupo controlo (Marteau *et al.*, 2002).

Foi também descrito que o uso de probióticos como *Lactobacillus gasseri* SBT2055, resultou na diminuição de tecido adiposo e dos níveis plasmáticos de colesterol, tanto em ratos Zucker magros como em ratos Zucker obesos (estes ratos são portadores de uma mutação que codifica para o gene da leptina e apresentam hiperfagia, hiperinsulinémia e hiperlipidémia (Beck, 2006; Oana *et al.*, 2005)). Desta forma, pensa-se que este probiótico poderá contribuir para a diminuição de doenças cardiovasculares (Arora *et al.*, 2013).

Embora alguns estudos tenham demonstrado que os probióticos podem ter efeitos benéficos em determinadas patologias, é necessário que se desenvolvam mais estudos, nomeadamente em humanos, para que desta forma se possa abrir horizontes a novas terapias através da aplicação de probióticos (Arora *et al.*, 2013).

4.2. Prebióticos

Gibson e Roberfroid, em 1995, apresentaram o termo prebióticos, tendo sido definidos como “ingredientes não digeríveis que beneficiam o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento ou actividade de um certo número de bactérias”. Os prebióticos tem como características o facto de não serem vivos, serem ingredientes alimentares que não sofrem hidrólise nem são absorvidos pelo intestino, resistirem à acidez gástrica e funcionarem como substratos para os probióticos, obtendo-se assim, uma relação simbiótica, melhorando a continuidade de bactérias no intestino. Exemplos mais comuns são oligofrutose, inulina, lactulose e galacto-oligossacarídeos (Candela *et al.*, 2010; Kechagia *et al.*, 2012).

Determinados estudos indicam que a lactulose é resistente às β -galactosidasas em humanos e, quando administrada, contribui para um considerável aumento de probióticos intestinais como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (Candela *et al.*, 2010).

Estudos em humanos obesos que tomavam o prebiótico oligofrutose demonstraram que havia redução do seu peso corporal, tendo também sido observado o controlo e redução do apetite devido à inibição de grelina e estimulação do Pyy, respetivamente (Parnell e Reimer, 2009).

Um estudo realizado em leitões demonstrou que a nutriose (um hidrato de carbono não digerível, com atividade prebiótica) pode levar ao aumento de *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* e *Bifidobacterium*. Verificou-se que, com o aumento destes géneros bacterianos, os animais beneficiaram de uma melhor regulação das respostas pró-inflamatórias, assim como à indução de citocinas, como IL-10, capazes de modular respostas imunológicas e de controlar a secreção de IgA. Este estudo indicou que a nutriose leva à estimulação da imunidade intestinal, impedindo o aparecimento de DII induzida pelo ácido trinitrobenzenossulfónico nos leitões (Pouillart *et al.*, 2010).

Claramente que são necessários mais estudos e mais investigação relativamente aos prebióticos para melhor entender como podem contribuir de forma a promover a saúde do hospedeiro (Candela *et al.*, 2010).

4.3. Intervenção na dieta

A dieta é um fator importante para o desenvolvimento do microbiota intestinal. Contudo, quando há uma dieta desequilibrada pode ocorrer alterações no microbiota intestinal e conseqüentemente levar a patologias (Anhe *et al.*, 2013).

Estudos indicaram que um consumo elevado de fibras por parte dos indivíduos parece beneficiar a saúde do cólon e também diminuir a incidência de patologias como DII e cancro cólon-retal (McIntosh *et al.*, 2003). Esta ação deve-se ao facto das fibras serem fermentadas pelas bactérias do intestino, formando posteriormente butirato, que é um AGCC. Pensa-se que o butirato tem a capacidade de inibir o crescimento celular e de também a diferenciação em células do cancro do cólon-retal (Blouin *et al.*, 2011). Segundo alguns estudos, tem ainda a capacidade de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelas DII (Segain *et al.*, 2000).

Um estudo teve por base verificar de que forma a biotransformação de polifenóis por microrganismos do microbiota intestinal em cultura *in vitro*, influenciava a composição das bactérias do intestino humano. Verificou-se que a fermentação de polifenóis levou à formação de AGCC, importantes na diminuição do pH do lúmen, na inibição da proliferação de patogénicos e no crescimento de *Bifidobacterium* (que confere proteção na invasão por patogénicos) e ainda, à redução na proporção de Firmicutes em comparação com os controlos (Parkaret *al.*, 2003; Queipo-Ortunõ *et al.*, 2012).

4.4. Transplante fecal

O transplante fecal implica substituição ou reposição da microbiota intestinal de um indivíduo que tenha alguma patologia do foro intestinal (Walker e Lawley, 2013). O transplante tem como base fezes processadas de um indivíduo saudável, para posterior transferência para o intestino de um indivíduo doente, por meio do enema (Smith *et al.*, 2014). Esta ação é de facto violenta, no sentido que vai alterar de forma abrupta a microbiota intestinal do indivíduo doente, sendo no entanto bastante eficaz.

Um estudo feito em pacientes com recorrente infeção pela bactéria *Clostridium difficile* demonstrou que o transplante fecal foi bem sucedido, sendo mais eficaz para o tratamento desta infeção, quando comparado com o tratamento com antibióticos como a vancomicina (Nood *et al.*, 2013).

Este tipo de tratamento será recomendado a indivíduos que têm DII, mas ainda não se efetuam transplantes uma vez que há receio de passagem de microrganismos patogénicos e também porque ainda se estão a identificar e a fazer triagem de doadores compatíveis (Walker e Lawley, 2013).

V. Perspetivas Futuras

O microbiota intestinal é considerado um “superorganismo”, sendo extremamente complexo. Alguns estudos realizados sobretudo em modelos animais permitiram já obter informação relevante quanto ao contributo do microbiota intestinal para a homeostasia do hospedeiro. Porém, novos estudos, novas investigações, novas técnicas serão indispensáveis e essenciais para compreender melhor o mundo do microbiota intestinal. Isto passa então pela melhor compreensão das interações com o hospedeiro, e de que forma determinados microrganismos podem contribuir para a saúde e ou para a doença. Alterações benéficas na composição e organização do microbiota intestinal podem ter efeitos na melhoria da saúde do hospedeiro (Walker e Lawley, 2013.)

Presentemente, o elevado investimento científico nos campos do microbiota e microbioma humanos, particularmente a nível intestinal, deverá resultar no desenvolvimento e melhoria de estratégias terapêuticas futuras (Walker e Lawley, 2013.)

VI. Conclusão

O microbiota intestinal define-se pelo conjunto de microrganismos existentes no intestino humano, enquanto o microbioma intestinal se define pelo genoma desses microrganismos. O agregado destas entidades é essencial para promover a saúde do hospedeiro, nomeadamente relações de simbiose.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular permitiram investigar, de forma mais completa, a composição e elevada diversidade do microbiota intestinal. O desenvolvimento do microbiota intestinal dá-se logo após o nascimento e a sua estabilização ocorre quando se atinge a fase adulta. Porém, está sempre em constante dinamismo. O microbiota intestinal pode ser afetado por variadíssimos fatores ambientais como dieta, estilo de vida, consumo de antibióticos e idade, levando por vezes a alterações drásticas na composição e diversidade do mesmo.

Alguns estudos descritos ao longo desta dissertação mostraram que o microbiota intestinal parece ter influência em funções do organismo como fisiologia, metabolismo e desenvolvimento dos sistemas neurológico e imunológico, nomeadamente do GALT. O microbiota intestinal parece então contribuir para o desenvolvimento e morfogénese de órgãos e para a manutenção do equilíbrio de tecidos e órgãos, assim como permitir a obtenção de energia partir da dieta. Situações como o contacto direto do microbiota intestinal com o epitélio intestinal leva a um constante desafio do sistema imunológico. Sendo assim, as interações adequadas entre microbiota intestinal e hospedeiro levam à criação de mecanismos de tolerância imunológica.

Perturbações no microbiota intestinal fazem com que a homeostasia do hospedeiro esteja comprometida, podendo levar a situações de patologia.

O conhecimento aprofundado da composição e atividade do microbiota intestinal deverá conduzir a novas intervenções terapêuticas com base na possível modulação desse microbioma, resultando numa melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

VII. Referências Bibliográficas

Abraham, C. e Cho, J. H. (2009). Inflammatory Bowel Disease. *The New England Journal of Medicine*, vol. 361, pp. 2066–2078.

Adamczak, D. M. *et al.* (2014). The Role of Toll-Like Receptors and Vitamin D in Diabetes Mellitus Type 1 - A Review. *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 80, pp. 75-84.

Anhe, F. F. *et al.* (2013). Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. *PharmaNutrition*, vol. 1, pp. 105-114.

Arora, T., Singh, S. e Sharma, R. K. (2013). Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition*, vol. 29, pp. 591–596.

Bakhtiar, S. M. *et al.* (2013). Implications of the human microbiome in inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 342, pp. 10-17.

Baumgart, D. C. e Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *Lancet*, vol. 380, pp. 1590-1605.

Baumgart, D. C. e Sandborn, W. J. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, vol. 369, pp. 1627-1640.

Beck, B. (2006). Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 361, pp. 1159-1185.

Bernardo, D. (2013). Células dendríticas del intestino humano como controladoras de la inmunidad mucosa. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, vol.105, pp. 279-290.

Bernstein, C. N. e Shanahan, F. (2008). Disorders of a modern lifestyle-reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut*, vol. 57, pp. 1185-1191.

Blouin, J-M. *et al.* (2011). Butyrate elicits a metabolic switch in human colon cancer cells by targeting the pyruvate dehydrogenase complex. *International Journal of Cancer*, vol. 128, pp. 2591-2601.

Biasucci, G. *et al.* (2008). Cesarean delivery may affect yearly biodiversity of intestinal bacteria. *The Journal of Nutrition*, vol. 138, pp. 1796S-1800S.

Bibiloni, R. *et al.* (2005). VSL#3 Probiotic-Mixture Induces Remission in Patients with Active Ulcerative Colitis. *American Journal of Gastroenterology*, 100, pp. 1-8.

Boerner, P. B. e Sarvetnick, N. E. (2011). Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice. *Annals of New York Academic Science*, vol. 1243, pp. 103-118.

Borre, Y. E. *et al.* (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends In Molecular Medicine*, vol. 20, pp. 509-518.

Brooks, G. F. *et al.* (2004). Normal Microbial Flora of the Human Body. *In*: Brooks, G. F. *et al.* (Eds.). *Medical Microbiology*, 23^a Edição. Mcgraw-Hill Education, pp. 198-199.

Brüssow, H. (2013). Microbiota and healthy ageing: observational and nutritional intervention studies. *Microbial Biotechnology*, vol. 6, pp. 326–334.

CanadianMetaMicroBiomeLibrary. Canadian metagenomic. [Em linha]. Disponível em <<http://www.cm2bl.org/background.html>>. [Consultado em 22/01/2014].

Candela, M. *et al.* (2010). Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 140, pp. 93-101.

Cerf-Bensussan, N. e Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes?. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, pp.735-744.

Claudiel, T., Staels, B. e Kuipers, F. (2005). The Farnesoid X Receptor: A Molecular Link Between Bile Acid and Lipid and Glucose Metabolism. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 25, pp. 2020-2030.

Crawford, P.A. e Gordon, J. I. (2005). Microbial regulation of intestinal radiosensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, pp. 13254-13259.

Cruvinel, W. M. *et al.* (2010). Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Reviews Bras Reumatologia*, vol. 50, pp. 434-61.

Daniel, R. (2004). The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 15, pp. 199-204.

Darfeuille-Michaud, A. *et al.* (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, vol. 127, pp. 412-421.

David, L. A. *et al.* (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, vol. 505, pp. 559–563.

Direção-Geral da Saúde (2005). Programa Nacional de Combate à Obesidade. [Em linha]. Disponível em <<http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008253.pdf>>. [Consultado 16/8/2014].

Doyle, M. E. e Egan, J. M. (2007). Mechanisms of action GLP-1 in the pancreas. *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 113, pp. 546-593.

Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, vol. 115, pp. 182-205.

Fiocchi, C. e Pereira de Sousa, H.S. (2012). Microbiota Intestinal - Sua importância e função. *Jornal Brasileiro de Medicina*, vol. 100, pp. 30-38.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006). Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. [Em linha]. Disponível em <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>>. [Consultado em 29/8/2014].

Foster, J. A. e Neufeld, K. A. M. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends In Neuroscience*, vol. 36, pp. 305-312.

Howitt, M. R. e Garrett, W. S. (2012). Gut microbiota and cardiovascular disease connectivity. *Nature Medicine*, vol. 18, pp. 1188-1189.

Jernberg, C. (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, vol. 156, pp. 3216-3223.

Kechagia, M. *et al.* (2013). Health Benefits of probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, vol. 2013, pp. 1-8.

Kim, J. J. e Sears, D. D. (2010). TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2010, pp. 1-12.

Lee, J. H., Reed, D. R. e Price, R. A. (2001). Leptin resistance is associated with extreme obesity and aggregates in families. *International Journal of Obesity*, vol. 25, pp. 1471-1473.

Ley, R. E. *et al.* (2008). Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews*, vol. 6, pp. 776-788.

Lim, G. E. e Brubaker, P. L. (2006). Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. *Diabetes*, vol. 55, pp. S70-S77.

Lim, Y. W. *et al.* (2013). Metagenomics and metatranscriptomics: windows on cf-associated viral and microbial communities. *Journal of CysticFibrosis*, vol. 12, pp. 154-164.

Lozupone, C. A. *et al.* (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, vol. 489, pp. 220-229.

Madigan, T. M. *et al.* (2006). *Brock Biology of Microorganisms*. In: Madigan, T. M. *et al.* (Eds.). *Microbial Symbioses*, 13ª Edição. Pearson, pp. 766-823.

Magrone, T. e Jirillo, E. (2013). The interaction between gut microbiota and age-related changes in immune function and inflammation. *Immunity & Ageing*, vol.10, pp. 1-6.

Mariat, D. *et al.* (2009). The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BioMed Central Microbiology*, vol. 9, pp. 1-6.

Marteau, P., Seksik, P. e Jian, R. (2002). Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition*, vol. 88, pp. S51–S57.

McIntosh, G. H. *et al.* (2003). Whole-grain rye and wheat foods and markers of bowel health in overweight middle-aged men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 77, pp. 967–974.

- McLean, P. G., Borman, R. A. e Lee, K. (2007). 5-HT in the enteric nervous system: gut function and neuropharmacology. *Trends In Neurosciences*, vol. 30, pp. 9-13.
- Meijer, B. J. e Dieleman, L. A. (2011). Probiotics in the Treatment of Human Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 45, pp. S139-S144.
- Meireles, A. P. (2012). Dieta, Microbiota e Obesidade. [Em linha]. Disponível em <<http://nutricaoevida.com.br/wp-content/uploads/2012/10/Tema-Dieta-Microbiota-e-Obesidade.pdf>>. [Consultado em 15/8/2014].
- Membrez, M. *et al.* (2008). Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *The FASEB Journal*, vol. 22, pp. 2416-2426.
- Moloney, R. D. *et al.* (2014). The microbiome: stress, health and disease. *Mamm Genome*, vol. 25, pp. 49-74.
- Morgan, X. C. e Huttenhower, C. (2012). Human Microbiome Analysis. *PLOS Computational Biology*, vol. 8, pp. 1-14.
- Mueller, K. *et al.* (2012). The Gut Microbiota. *Science*, vol. 336, pp. 1245.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. e Pfaller, M. A. (2005). Commensal and Pathogenic Microbial Flora in Humans. *In*: Murray, P. R., Rosenthal, K. S. e Pfaller, M. A. (Eds.). *Medical Microbiology*, 5ª Edição. Mosby/Elsevier, pp. 84-85.
- Musso, G., Gambino, R. e Cassader, M. (2010). Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota. *Diabetes Care*, vol. 33, pp. 2277-2284.
- Myers Jr, M. G. *et al.* (2010). Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 21, pp. 643-651.
- Nayariseri, A. *et al.* (2013). Impact of next-generation whole-exome sequencing in molecular diagnostics. *Drug Invention Today*, vol. 5, pp. 327-334.
- Nood, E. V. *et al.* (2013). Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine*, vol. 368, pp. 407-415.

Oana, F. *et al.* (2005). Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism*, vol. 54, pp. 995-1001.

O'Mahony, S. M. *et al.* (2014). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, doi:10.1016/j.bbr.2014.07.027, pp. 1-17.

Padmanabhan, R. *et al.* (2013). Genomics and metagenomics in medical microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 95, pp. 415-424.

Parkar, S. G., Trower, T. M. e Stevenson, D. E. (2013). Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe*, vol. 23, pp. 12-19.

Parnell, J. L. e Reimer, R. A. (2009). Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 89, pp. 1751-1759.

Penders, J. *et al.* (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, vol. 118, pp. 511-521.

Petrof, E. O. (2009). Probiotics and Gastrointestinal Disease: Clinical Evidence and Basic Science. *Antiinflammatory Antiallergy Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 8, pp. 260-269.

Pineiro, M. e Stanton, C. (2007). Probiotic Bacteria: Legislative Framework - Requirements to Evidence Basis. *The Journal of Nutrition*, vol. 37, pp. 850S-853S.

Pouillart, P. R. *et al.* (2010). Nutriose, a Prebiotic Low-digestible Carbohydrate, Stimulates Gut Mucosal Immunity and Prevents TNBS-induced Colitis in Piglets. *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 16, pp. 783-794.

Prakash, S. *et al.* (2011a). Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: Targets and Therapy*, vol. 5, pp. 71-86.

Prakash, S. *et al.* (2011b). The Gut Microbiota and Human Health with an Emphasis on the Use of Microencapsulated Bacterial Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, pp. 1-12.

Preidis, G. A. e Versalovic, J. (2009). Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: Gastroenterology enters the metagenomics Era. *Official Journal of the AIA Institute*, vol. 136, pp. 2015-2031.

Queipo-Ortuño, M. I. *et al.* (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 95, pp. 1323-1334.

Reinhardt, C. *et al.* (2012). Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature*, vol. 483, pp. 627-631.

Rodrigues, A. (2011). Microbiota Intestinal e sua Possível Relação com a Obesidade. *Abeso*, vol. 53, pp. 5-7.

Roesch, L. F.W. *et al.* (2009). Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. *The ISME Journal*, vol. 5, pp. 536-548.

Rook, G.A. (2010). 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: darwinian medicine and the 'hygiene' or 'old friends' hypothesis. *Clinical Experimental Immunology*, vol. 160, pp. 70-79.

Salonen, A. e Vos, W. M. de (2014). Impact of Diet on Human Intestinal Microbiota and Health. *The Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 5, pp. 239–262.

Sanders, M-E. (2008). Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 46, pp. S58–S61.

Scholz, M. B., Lo, C. e Chain, P. S. G. (2012). Next generation sequencing and bioinformatics bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. *Analytical biotechnology*, vol. 23, pp. 9-15.

Scott, K. P. *et al.* (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, vol. 69, pp. 52-60.

Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (2003a). Aparelho Circulatório. In: Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (Eds.). *Anatomia e Fisiologia*, 6ª Edição. Loures, Lusociência, pp. 651-678.

Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (2003b). Sistema Linfático e Imunidade. *In*: Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (Eds.). *Anatomia e Fisiologia*, 6ª Edição. Loures, Lusociência, pp. 783-824.

Segain, J-P. *et al.* (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, vol. 47, pp. 397-403.

Sekirov, I. *et al.* (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews Published*, vol. 90, pp. 859-904.

Singh, B. *et al.* (2008). Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: potential biotechnological prospects. *Anaerobe*, vol. 14, pp. 138-144.

Sjögren, K. *et al.* (2012). The gut microbiota regulates bone mass in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 27, pp. 1357-1367.

Smith, M-B., Kelly, C. e Alm, E. J. (2014). Policy: How to regulate faecal transplants. *Nature*, vol. 506, pp. 290-291.

Sommer, F. e Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 11, pp. 227-238.

Swidsinsk, A. *et al.* (1998). Association Between Intraepithelial *Escherichia coli* and Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, vol. 115, pp. 281-286.

Talaro, K. P. (2008). Microbe-Human Interactions. *In*: Talaro, K. P. (Eds.). *Foundations in Microbiology*, 6ª Edição. Dubuque, Iowa, McGraw-Hill Higher International Education, pp. 384-387.

Thaiss, C. A. *et al.* (2014). The interplay between the innate immune system and the microbiota. *Current Opinion in Immunology*, vol. 26, pp. 41-48.

Thomas, C. *et al.* (2009). TGR5-Mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metabolism*, vol. 10, pp. 167-177.

Tremaroli, V. e Bäckhed, F. (2012). Functional Interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, vol. 489, pp. 242-249.

Turnbaugh, P. J. *et al.* (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, vol. 444, pp. 1027-1031.

Turnbaugh, P. J. *et al.* (2007). The Human Microbiome Project. *Nature*, vol. 449, pp. 804-810.

Turnbaugh, P. J e Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of Physiology*, vol. 587, pp. 4153-4158.

Ursell, L. K. *et al.* (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, vol. 70, pp. 38-44.

Vaarala, O., Atkinson, M. A. e Neu, J. (2008). The “Perfect Storm” for Type 1 Diabetes. *Diabetes*, vol. 57, pp. 2555-2562.

Walker, A. W. e Lawley, T. D. (2013). Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological Research*, vol. 69, pp. 75-86.

Wang, Z. *et al.* (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, vol. 472, pp. 57-63.

Weinstock, G. M. (2012). Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*, vol. 489, pp. 250-256.

Willey, J. M., Sherwood, L. M. e Woolverton, C. J. (2009). Nonspecific (innate) Host Resistance. *In: Willey, J. M., Sherwood, L. M. e Woolverton, C. J. (Eds.). Prescott's Principles of Microbiology, 7ª Edição.* McGraw-Hill Higher International Education, pp. 656-677.

Willing, B. P., Russell, S. L. e Finlay. B. B. (2011). Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualismo. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 9, pp. 233-243.

Willing, B. *et al.* (2009). Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 15, pp. 653-660.

World Health Organization (2014a). Cardiovascular diseases. [Em linha]. Disponível em <http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/en/>. [Consultado em 15/08/2014].

World Health Organization (2014b). Diabetes. [Em linha]. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. [Consultado em 15/08/2014].

World Health Organization (2014c). Obesity. [Em linha]. Disponível em <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/>. [Consultado em 15/08/2014].

Zaroweicki, M. (2012). Metagenomics with guts. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, pp. 674.

Zhou, Y. J. *et al.* (2012). NOD1 activation induces innate immune responses and insulin resistance in human adipocytes. *Diabetes & Metabolism*, vol. 38, pp. 538-543.