



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA HUMANO**

Trabalho submetido por  
**Anabela Cristina da Silva Fajardo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**novembro de 2015**



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA HUMANO**

Trabalho submetido por  
**Anabela Cristina da Silva Fajardo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutor Nuno Eduardo Moura dos Santos da Costa Taveira**

novembro de 2015

*“Suba o primeiro degrau com fé. Você não tem que ver toda a escada.*

*Você só precisa dar o primeiro passo.”*

*Martin Luther King Jr*

## **Dedicatória**

Dedico esta dissertação de Mestrado aos meus pais, Isaura Fajardo e Manuel Fajardo, por terem sido as pessoas que mais me apoiaram. Acreditaram em mim e nas minhas capacidades do início ao fim. Valorizo todos os sacrifícios que fizeram e o fato de por vezes terem abdicado de certas coisas para que tudo se tornasse possível, pois sei que fizeram um grande investimento. Deram-me a oportunidade de concretizar uma etapa muito importante da minha vida e dou muito valor a isso. Sei que aproveitei e dediquei-me da melhor forma. Foram e são uns pais espetaculares do qual me orgulho imenso.

Dedico também há minha família pois sei que estão felizes por partilharem comigo a concretização de mais um sonho.

Além disso dedico ainda a toda a equipa da Farmácia Portugal, em Setúbal, pois marcaram-me a nível pessoal e profissional. À Farmácia Monte Belo, em Setúbal, pelo facto de contribuírem para o meu crescimento profissional.

De seguida, dedico à Cooperativa Egas Moniz, equipa e professores. Posso dizer que o ISCSEM era a minha segunda casa. Não poderia ter escolhido melhor universidade para fazer o curso.

Quero ainda dedicar aos meus amigos de curso: Ana Margarida Lourenço, Ana Miguel Barroco, Ana Sofia Saraiva, João Andrez, Miguel Faria e Patrícia Ferreira. Em 5 anos tornaram-se muito importantes para mim e ensinaram-me o que são amigos de verdade.

Por último e não menos importante dedico ao prof. doutor Nuno Taveira. Sempre o admirei muito quer como pessoa como profissional. Quero desta forma felicitar todo o seu desempenho e dedicação. Desejo-lhe a continuação de um grande sucesso nas suas investigações e restante trabalho profissional. É um orgulho para mim ter sido o meu orientador.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Cooperativa Egas Moniz por todo o carinho e empenho prestado, a todos os docentes e não docentes, pela disponibilidade, ensinamentos e amizade.

Ao prof. doutor Nuno Taveira, toda a atenção prestada quanto orientador e como professor.

Com todo o amor e carinho, agradeço desta forma aos meus pais a oportunidade que me deram, a vossa dedicação e o esforço que fizeram para que conseguisse alcançar este objetivo entre os vários que tenho. Agradeço toda aquela compreensão, paciência e apoio quando estava mais cansada e desmotivada. Obrigada mãe quando dizias "Força Ana, está quase!" e obrigado pai quando dizias "Isso custa alguma coisa?!". São estas expressões que ficam na minha memória ao fim destes cinco anos. Obrigada por todas as maravilhas que me têm proporcionado.

Agradeço há minha família que me apoiou e acreditou em mim até ao fim.

Ao Wilson Guerreiro por me ter apoiado e ajudado a ultrapassar uma fase menos boa da minha vida pessoal, fazendo desta forma que tudo decorresse da melhor forma.

Ao Luís Marques pela amizade, carinho e energia transmitida.

Ao Miguel Faria por ter estado sempre do meu lado quando me sentia mais cansada. Através de poucas e simples palavras colocava-me um sorriso no rosto e transmitia a força para continuar esta batalha.

Por último, agradeço ao meu padrinho universitário, João Carrasquinho, por toda a atenção prestada, ajuda e carinho quando mais precisava. Apesar de ter finalizado o curso mais cedo, quis sempre acompanhar de perto todo o meu percurso.

## Resumo

O ser humano é constituído por dez vezes mais bactérias que células humanas. Este deixa de ser estéril a partir do momento em que nasce, sendo colonizado por bactérias dependendo do tipo de parto e da dieta.

Existe uma grande diversidade microbiana intra e interpessoal, apesar destes microrganismos poderem sofrer alterações devidas a diversos fatores, conduzindo a doenças. No entanto, os microrganismos comensais desempenham funções importantes e beneficiam de certa forma o seu hospedeiro.

O Projeto Microbioma Humano (HMP) tem como objetivo a caracterização e identificação dos microrganismos que habitam o ser humano e o estudo de fatores que provocam alterações destes. Para tal, têm surgido novas técnicas de estudo do microbioma humano de forma a ultrapassar as limitações de cultivo de certas espécies bacterianas.

Nesta dissertação foi analisada a diversidade do microbiota na cavidade oral, pele, trato urogenital e trato gastrointestinal. No entanto, o trato gastrointestinal é o que apresenta uma maior diversidade. Esta grande diversidade tem melhorado o perfil metabólico e respostas imunológicas. Além disso, o microbiota tem demonstrado viabilidade de auxílio na terapêutica de doenças através da estimulação do sistema imunitário.

Por outro lado, quando o microbioma sofre alterações, este fica mais susceptível a certas infeções. No caso do microbioma vaginal, quando este sofre desequilíbrios pode desencadear vaginose bacteriana, ficando a mulher mais susceptível a infeção por VIH quando em contato com o vírus.

Nesta dissertação verifica-se que os microrganismos não são sempre patogénicos como a maioria das pessoas pensam, podendo virem a ser a solução para várias doenças.

**Palavras-chave:** microbioma humano, diversidade, microrganismos, técnicas moleculares

## **Abstract**

The human being is constituted by ten more bacteria than human cells. It stops being sterile as soon as it is born, being colonized by bacterial depending on the parturition type and the diet.

There is a large intra and inter-personal microbial diversity, although these organisms may suffer changes due to several factors, leading do diseases. However, commensal microorganisms develop important functions and benefit the host in a certain way.

The Human Microbiome Project (HMP) has the objective of characterization and identification of the microorganisms that inhabit the human being and the study of the factors that cause changes to them. For such, new techniques for studying the human microbiome have appeared in a way of surpassing the limitations of the culture of certain bacterial species.

In this dissertation was analyzed the microbiota diversity on the oral cavity, skin, urogenital tract and gastrointestinal tract. However, the gastrointestinal tract is the one shows more diversity. This high diversity has been improving the metabolic profile and immunological responses. Furthermore, the microbiota has been demonstrating viability in the support of therapy of diseases through the stimulation of the immune system.

On the other hand, when the microbiome suffers changes, it becomes more susceptible to certain infections. In the case of the vaginal microbiome, when it suffers imbalances it might initiate bacterial vaginosis, increasing the susceptibility of the woman to the HIV infection when in contact with the virus.

In this dissertation it is verified that the microorganisms are not always pathogenic as most people think and may become a possible solution for several diseases.

**Key-words:** human microbiome, diversity, microorganisms, molecular techniques

## Índice Geral

<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>9</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>11</b>
<b>Glossário.....</b>	<b>12</b>
1. Introdução.....	13
1.1 Desenvolvimento do microbioma humano.....	14
2. Funções e Benefícios.....	19
3. Projeto Microbioma Humano.....	23
4. Técnicas de estudo do microbioma humano.....	25
4.1 Diversidade taxonômica molecular.....	27
4.1.1 Gene marcador 16S rRNA.....	27
4.1.1.1 Sequenciação do gene 16S rRNA.....	28
4.1.2 Sequências em OTUs.....	30
4.1.2.1 Diversidade populacional.....	30
4.1.3 The Shotgun Metagenomic.....	32
4.1.4 Checkerboard DNA-DNA hybridization.....	34
4.1.5 Desnaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).....	35
4.1.6 Pirosequenciação.....	35
4.1.7 Viroma.....	36
5. Microbioma Humano.....	39
5.1 Cavidade Oral.....	41
5.2 Pele.....	43
5.3 Trato Urogenital.....	46
5.4 Trato Gastrointestinal.....	50
6. Distúrbios no Microbioma.....	53
6.1 Dieta.....	53
6.2 Antibióticos.....	54
6.3 Doenças.....	54
6.3.1 Obesidade.....	54



6.3.2	Alergias.....	54
6.4	Perspetivas futuras.....	57
6.4.1	Probióticos, prebióticos e simbióticos.....	57
6.4.2	Interação medicamentosa com probióticos.....	58
7.	Microbioma Humano e Imunoterapia.....	59
8.	Microbioma Humano e Human Immunodeficiency Virus (HIV).....	61
8.1	Efeito protetor do microbiota vaginal.....	62
8.2	Microbioma so sémen e infeção por HIV.....	63
9.	Conclusão.....	67
10.	Bibliografia.....	69

## Índice de Figuras

Figura 1- Desenvolvimento microbiano no ser humano ao longo da vida.....	14
Figura 2- Transmissão vertical e horizontal do microbioma.....	17
Figura 3- Funções do microbioma humano.....	21
Figura 4- Anton Van Leeuwenhoek.....	25
Figura 5- Escolha dos Primers na amplificação das regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA.....	28
Figura 6- A metagenômica e métodos bioinformáticos.....	31
Figura 7- Análise do Microbioma Humano.....	37
Figura 8- Análise do microbioma humano através de sequenciação e estratégias bioinformáticas.....	38
Figura 9- Microbioma humano comensal.....	39
Figura 10- Mapa da diversidade microbiana.....	40
Figura 11- Representação colorimétrica dos gêneros bacterianos obtidos através da análise do gene 16S rRNA e respectiva abundância.....	42
Figura 12- Fatores que favorecem alterações no microbioma da pele.....	44
Figura 13- Distribuição dos microrganismos na pele.....	45
Figura 14- Microbioma vaginal na gravidez e no pós-parto.....	49
Figura 15- Microbioma Intestinal no recém-nascido dependendo do tipo de parto e amamentação.....	51
Figura 16- Patologias resultantes de disbiose do microbioma humano.....	56

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1- Vantagens e Desvantagens da Sequenciação do gene 16S rRNA.....	34
Tabela 2- Vantagens e Desvantagens do Checkboard DNA-DNA Hybridization.....	34
Tabela 3- Vantagens e Desvantagens do DGGE.....	35

## **Lista de Abreviaturas**

ART- Antiretroviral therapy

DNA- Deoxyribonucleic acid

DST- Doença sexualmente transmissível

HIV- Human Immunodeficiency Virus

HMP- Human Microbiome Project

HSH- Homens que fazem sexo com homens

PCR- Polimerase Chain Reaction

SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

## **Glossário**

**Gene 16S rRNA:** Componente de ribossomas de procariotas altamente conservado entre diferentes espécies de bactérias e é usado para estudos filogenéticos.

**Metagenoma:** Coleção de genomas dentro de comunidades microbianas complexas e DNA humano.

**Microbioma:** Conteúdo genético da comunidade microbiana, ou seja, conjunto de genomas dos microrganismos que habitam nos seres humanos.

**Microbiota:** Estrutura da comunidade microbiana.

**Primer:** Sequências iniciadoras que geralmente são universais.

## 1. Introdução

O número de bactérias no corpo humano é dez vezes superior ao número de células humanas (National Institutes of Health, 2012), pelo que cada indivíduo apresenta 10 a 100 trilhões de células microbianas que se encontram em simbiose com este. (Ursell, Metcalf, Parfrey, & Knight, 2012)

Apesar de alguns indivíduos compartilharem mais de 99,9% do genoma humano, existem diferenças no microbiota (70-90%). O microbiota contém pelo menos 100 vezes mais genes do que os constituintes humanos. Isto leva a pensar até que ponto a comunidade microbiana determina respostas fisiológicas humanas e a susceptibilidade a doenças. Portanto, a evidência de que essas comunidades microbianas afetam a nossa saúde e que podem ser manipuladas para curar doenças é um caminho a seguir para intervenções terapêuticas, visto que o microbioma é mais fácil de alterar que o genoma humano. (Parfrey & Knight, 2012)

Ao conjunto da diversidade genética de microrganismos, bactérias, vírus, fungos, protozoários e arqueas, distribuídos nas várias partes do organismo humano denomina-se microbioma (The Human Microbiome Project Consortium, 2012), sendo que cada ser humano tem um microbioma único. (Parfrey & Knight, 2012) Este geralmente é estável ao longo do tempo sendo resistente a perturbações, mas pode variar no tempo e de acordo com a região corporal, na mesma pessoa e de pessoa para pessoa. (Parfrey & Knight, 2012) Esta grande diversidade deve-se a vários fatores, tais como a exposição aos microrganismos após o nascimento, a idade, a genética (fator intrínseco), a dieta, intervenções terapêuticas e estímulos ambientais (fatores extrínsecos). (Nelson, Diven, Huff, & Paulos, 2015) Indivíduos saudáveis podem variar entre si no microbioma, (The Human Microbiome Project Consortium, 2013) sendo a variação do microbioma entre indivíduos maior do que no mesmo indivíduo ao longo do tempo. (Grice & Segre, The Human Microbiome: Our Second Genome, 2012)

Disbioses, ou seja, alterações nas comunidades microbianas, têm sido implicadas numa variedade de estados de doença (obesidade, diabetes, distúrbios vaginais e bacterianos da pele, entre outros). Assim sendo, a composição do microbiota pode ser manipulada para causar doença ou para melhorar a saúde, alterando a dieta por exemplo. (Parfrey & Knight, 2012)

O facto de se verificar que o microbiota da pele de um individuo é único e estável ao longo do tempo, há a hipótese da comunidade bacteriana ser usada na identificação forense de indivíduos, com uma precisão de 95%, através da análise de objectos que o individuo contactou directamente. (Parfrey & Knight, 2012) Neste tipo de análises é usada a técnica de pirosequenciação, de forma a comparar os microrganismos da pele e dos objectos. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

### 1.1 Desenvolvimento do microbioma humano

Os microrganismos que constituem o microbioma humano são adquiridos maioritariamente durante o nascimento. O feto é estéril durante a gestação, (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012) mas a passagem do feto através do trato geniturinário da progenitora, pele e trato respiratório daqueles que o manuseiam são os fatores de exposição e colonização, predominando os microrganismos que melhor se adaptam. (Nelson, Diven, Huff, & Paulos, 2015) Estes microrganismos podem diferir consoante o tipo de parto: parto normal ou cesariana. No parto normal, o recém-nascido adquire o microbiota da vagina da progenitora enquanto que por cesariana o microbiota adquirido é o da pele (Ursell, Metcalf, Parfrey, & Knight, 2012), prevalecendo *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium spp.* (ver figura 1) (Dominguez-Bello, Blaser, Ley, & Knight, 2011)

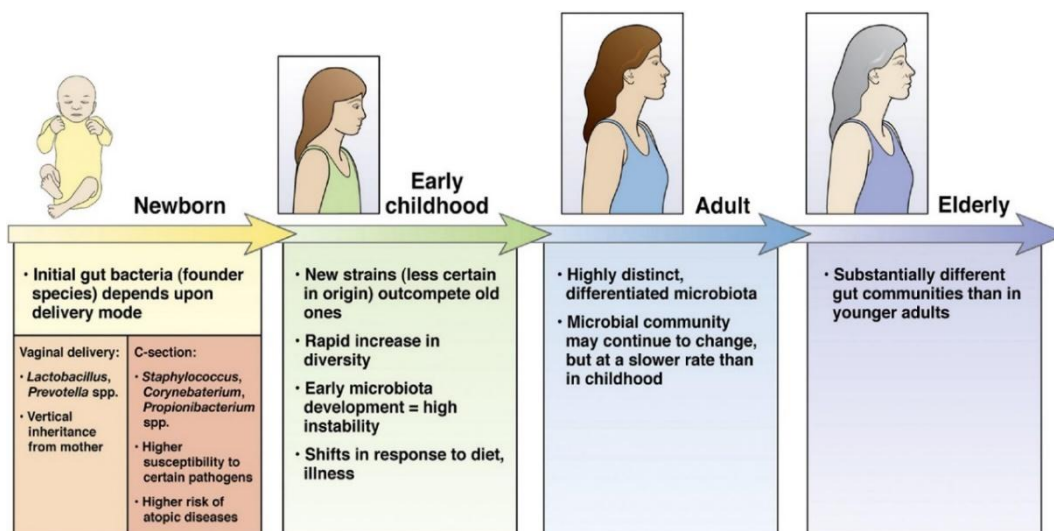


Figura 1- Desenvolvimento microbiano no ser humano ao longo da vida. (Retirado de (Dominguez-Bello, Blaser, Ley, & Knight, 2011)) – No recém-nascido, as bactérias que colonizam o intestino depende do tipo de parto (parto normal ou cesariana). Na primeira infância há um rápido

aumento da diversidade microbiana e além disso existe uma grande instabilidade do microbiota devido às alterações de dieta e doenças. No adulto, o microbiota é altamente distinto e diferenciado e apesar de poder ocorrer alterações neste, ocorre a um ritmo mais lento. No Idoso, a comunidade intestinal é diferente dos adultos mais jovens.

A vagina é colonizada por relativamente poucas espécies bacterianas, sendo que *Lactobacillus* representa cerca de 50% da população bacteriana vaginal. No momento do parto, esta é dominada por *Lactobacillus* e *Prevotella spp.* No entanto, a comunidade bacteriana vaginal sofre modificações durante a gravidez, de modo a fornecer microrganismos benéficos. Quando o pH vaginal se encontra alto significa que há uma redução de *Lactobacillus* e quando este pH se torna mais ácido há um aumento de *Lactobacillus*, predominando *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus crispatus*, (Dominguez-Bello, Blaser, Ley, & Knight, 2011) como veremos mais a frente.

O recém-nascido adquire quase a totalidade de microrganismos que irão fazer parte de si na vida adulta, ao fim de duas semanas de vida, verificando-se posteriormente a estabilização do seu microbioma por volta dos 3 anos de idade. (Nelson, Diven, Huff, & Paulos, 2015) No entanto, em alguns momentos da vida verificam-se alterações do microbiota intestinal, tal como na introdução da dieta com leite materno, na presença de febre, na introdução de dieta de adulto e antibioterapia. Cada mudança na dieta altera a microbiota intestinal e enriquece os genes correspondentes. (Ursell, Metcalf, Parfrey, & Knight, 2012) Na verdade, cada um de nós enfrenta uma grande modificação do microbioma durante a vida. (Parfrey & Knight, 2012)

As bactérias existentes nas várias regiões do corpo são muito diferentes, sendo que o trato gastrointestinal e a boca apresentam maior diversidade microbiana. (Ursell, Metcalf, Parfrey, & Knight, 2012) No entanto, o microbiota mais semelhante entre a população é o da boca e o da vagina. (Parfrey & Knight, 2012)

A diversidade encontrada no intestino humano permite a digestão de compostos através das vias metabólicas, aumentando desta forma a capacidade de extrair energia a partir de diferentes dietas. A microbiota intestinal parece ter também um papel importante na obesidade, como veremos mais adiante. (Ursell, Metcalf, Parfrey, & Knight, 2012)



O genótipo parece influenciar a colonização pois estudos realizados através da desnaturação do gene 16S rRNA demonstram que gêmeos monozigóticos apresentam um microbioma semelhante. No entanto, a influência do genótipo permanece inexplicável e mudanças no genoma fazem variar o microbioma do trato gastrointestinal. (Dominguez-Bello, Blaser, Ley, & Knight, 2011)

Nos EUA mais de 30% dos nascimentos em 2007 ocorreram por cesariana, pelo que estes recém-nascidos não foram expostos aos microrganismos vaginais. Esta diferença de colonização dependendo do tipo de parto, afeta o desenvolvimento da comunidade bacteriana do trato gastrointestinal e poderá contribuir para uma maior susceptibilidade a determinados agentes patogénicos. Pensa-se que poderá contribuir para o aumento do risco de doenças atópicas (alergias, asma) e cerca de 64-82% de infeção da pele por MRSA ocorre em recém-nascidos nascidos por cesariana, pelo que os microrganismos vaginais parecem desempenhar um papel protetor contra a colonização por patogéneos. (Dominguez-Bello, Blaser, Ley, & Knight, 2011)

A partilha de microrganismos ocorre de forma intra-familiar e entre gerações. A transmissão vertical de mãe para filho através do parto predomina, sendo que pai e irmão contribuem também de alguma forma para a transmissão pois estes partilham o mesmo habitat. A partilha de recursos e de locais com o resto da população numa cidade, faz com que ocorra transmissão horizontal. (ver figura 2) (Dominguez-Bello & Blaser, 2011) Além disso, é de salientar que as comunidades microbianas estão sempre a ser transferidas de superfície em superfície, pelo que esta possa ser mais uma causa da transmissão horizontal. (Ursell, Metcalf, Parfrey, & Knight, 2012)

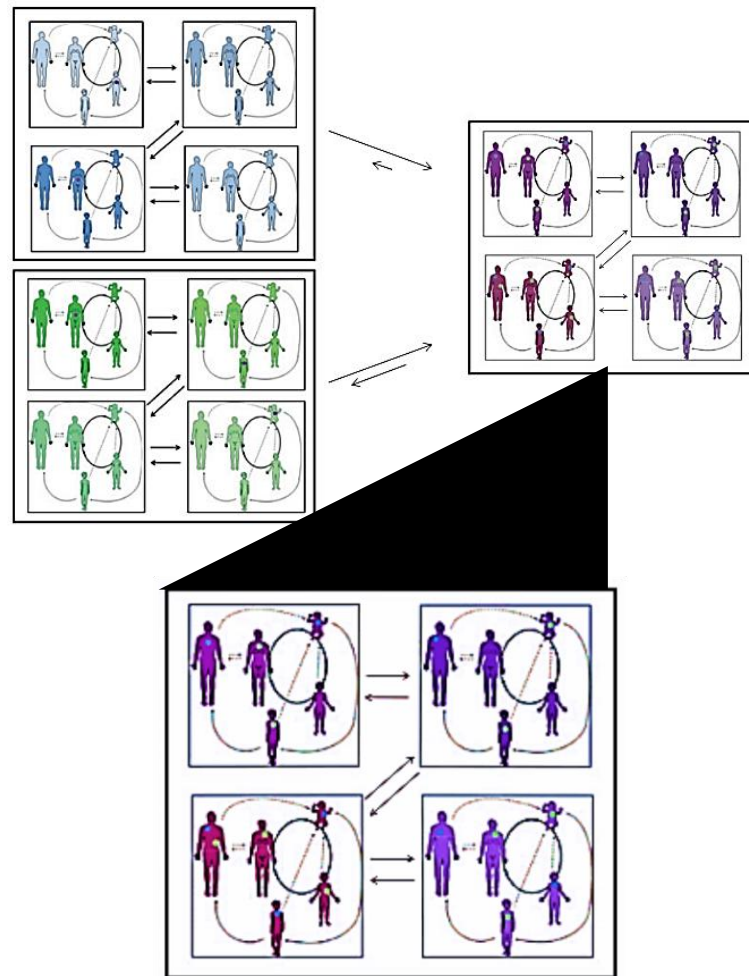


Figura 2- Transmissão vertical e horizontal do microbioma. (Adaptado de (Dominguez-Bello & Blaser, 2011)) – Esta figura representa bem a transmissão vertical e horizontal, sendo que os indivíduos da mesma cor representam uma família. Nesta imagem verifica-se que o relacionamento entre a população leva a alterações no microbioma (bolinhas coloridas). (Dominguez-Bello & Blaser, 2011)

Como iremos ver, esta diversidade de microrganismos que habita o ser humano encontra-se em harmonia com este, desempenhando um papel fundamental na manutenção de uma vida equilibrada e saudável. Estes, além de ajudarem na digestão e aquisição de nutrientes, têm demonstrado impacto na saúde e em doenças através do sistema imunológico. (Nelson, Diven, Huff, & Paulos, 2015)



## 2. Funções e Benefícios

Como mencionado anteriormente, o trato gastrointestinal é colonizado por uma grande diversidade de bactérias, sendo a sua maioria anaeróbias obrigatórias que se encontram no intestino grosso. As bactérias comensais desempenham um papel importante na manutenção da homeostase da imunidade intestinal e para a fisiologia humana. O desequilíbrio deste ecossistema tem sido associado com o desenvolvimento de várias doenças inflamatórias intestinais. *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Akkermansia muciniphila* e bactérias filamentosas segmentadas são responsáveis pela manutenção desta homeostase e representam um papel protetor da saúde. (Maier, Anderson, & Roy, 2015)

Uma grande parte da saúde humana depende dos benefícios simbióticos da relação entre hospedeiro-microrganismo. O microbiota intestinal apresenta uma função protetora pois previne a colonização da mucosa por patogêneos, ocupando o epitélio de forma a evitar a aderência e a invasão destes, havendo assim resistência à colonização. Além deste método, as bactérias também podem inibir a invasão por patogêneos, diretamente, produzindo substâncias antimicrobianas como bacteriocinas ou indiretamente, competindo por nutrientes disponíveis. (Maier, Anderson, & Roy, 2015)

A microbiota intestinal fornece a energia e os nutrientes ao hospedeiro através da degradação de alimentos não digeríveis no intestino grosso. Apresenta um papel importante metabólico através da síntese de vitaminas K e B12, ácido fólico e ácidos gordos de cadeia curta como o acetato, propionato e butirato. Este último tem particularmente uma ação central de fornecer energia aos colonócitos. Além disso, desempenha ações anti-inflamatórias, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias em amostras de biópsia do cólon e em células provenientes de doentes com doença de Crohn, por exemplo. (Maier, Anderson, & Roy, 2015)

Os modelos de animais livres de microrganismos servem apenas para estudar o efeito da colonização por uma bactéria ou comunidade bacteriana nos processos fisiológicos do hospedeiro. É importante a colonização do trato gastrointestinal para o desenvolvimento do sistema imunitário. A microbiota é ainda responsável pela regulação da angiogênese intestinal. (Maier, Anderson, & Roy, 2015)

Em adultos, a maior parte das bactérias intestinais pertencem apenas a alguns filos, sendo Bacteroidetes e Firmicutes geralmente dominantes. (Siezen & Kleerebezem, 2011)

Siezen e Kleerebezem (2011) propuseram o termo "faecotypes" em vez de "Enterotypes", pois a abundância microbiana e a composição muda ao longo do trato gastrointestinal e, talvez "enterotypes" pode não refletir a composição microbiana intestinal total. (Siezen & Kleerebezem, 2011)

O microbioma intestinal desempenha um papel importante na digestão e nutrição, sendo que este varia de acordo com a dieta. Além disso, é uma fonte de diversidade genética.

O microbioma encontra-se assim em relação simbiótica com o hospedeiro, desempenhando inúmeras funções tais como:

- Ocupação de locais por bactérias comensais de forma a evitar a colonização da pele e mucosas por bactérias patogénicas (antagonismo bacteriano);
- Produção de mucina, de modo a formar uma barreira que diminui a capacidade de adesão de bactérias patogénicas;
- Produção de ácidos gordos pelas bactérias comensais existentes na pele, prevenindo o aparecimento de espécies indesejáveis;
- Produção de substâncias com actividade antibacteriana no intestino (bacteriocinas), ajudando desta forma a prevenir a colonização de bactérias patogénicas;
- Produção de nutrientes tal como a vitamina B e K, sendo esta última essencial para a síntese de vários fatores de coagulação. Os tecidos necessitam de vitamina B12 para a síntese de DNA e processamento de ácidos gordos;
- Produção de enzimas necessárias ao processamento do alimento para melhor obtenção de nutrientes e eficácia na manutenção/ reparação de tecidos e órgãos. Estas permitem digerir carboidratos complexos;
- Controlo do apetite e saciedade;

- Estimulação imunológica pelas bactérias comensais, conferindo ao hospedeiro proteção contra muitas bactérias patogênicas. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

Para complementar o que foi mencionado anteriormente, a figura seguinte enumera algumas das funções do microbioma humano.

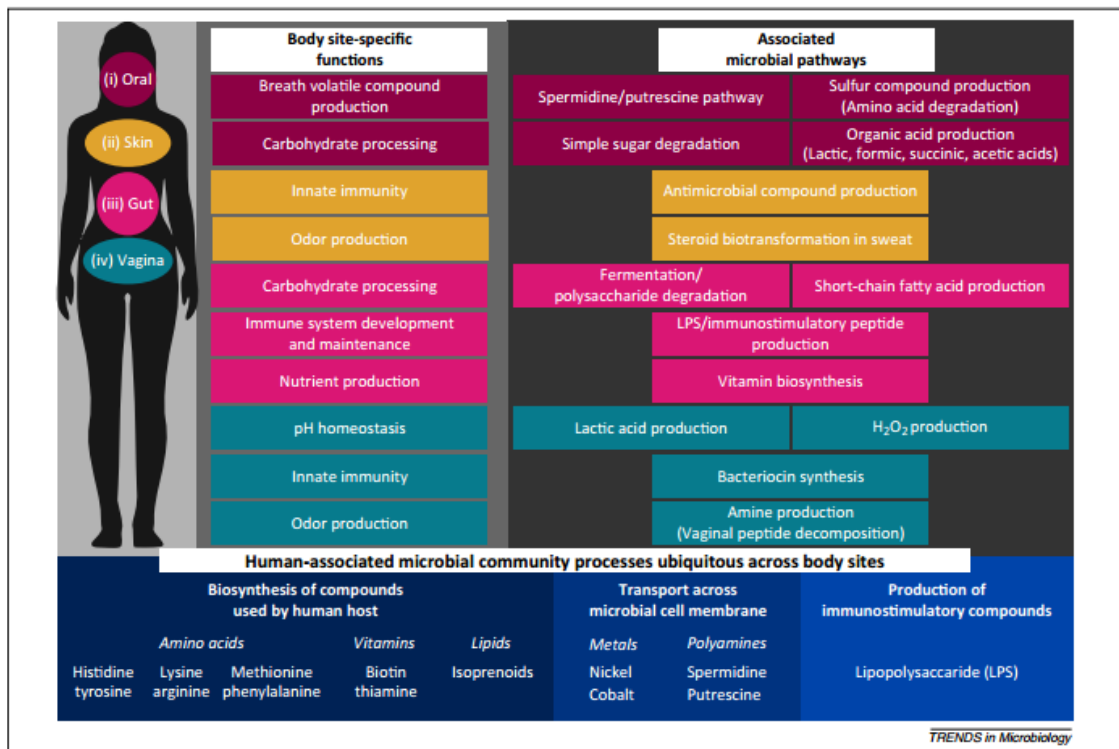


Figura 3- Funções do microbioma humano. (Retirado de (Turnbaugh, et al., 2007))

Resumindo, os microrganismos comensais contribuem para a nutrição, para a regulação da angiogênese intestinal, para a proteção contra patógenos e no desenvolvimento da resposta imunitária, (Maier, Anderson, & Roy, 2015) pelo que são responsáveis por um largo espectro de atividade biológica. (Segata, et al., 2013)



### 3. Projeto Microbioma Humano

O Projeto Microbioma Humano (HMP) é um dos projetos mais importantes, que engloba várias partes do mundo tal como EUA, Ásia e União Europeia. (Turnbaugh, et al., 2007) Os investigadores acreditam que a compreensão da saúde humana e das doenças é impossível sem a compreensão de todo o microbioma humano. (Dewhirst, et al., 2010)

Uma das questões que este projeto se debruça é se todos os seres humanos compartilham um núcleo de microbioma que seja identificável e se sim como é adquirido. Este núcleo engloba tudo aquilo que é comum entre o microbioma e todos os seres humanos, tal como as relações funcionais. Além disso, outra questão em contínua investigação são os fatores que afetam a diversidade do microbioma. (Turnbaugh, et al., 2007)

Projeto Microbioma Humano (HMP), lançado em 2007 tem como objectivo identificar e caracterizar os microrganismos que se encontram em associação com os seres humanos saudáveis e doentes e avaliar as suas alterações. (NIH, s.d.) Além disso, é uma iniciativa do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos. Por outro lado, o Projeto Metagenómica do Trato Intestinal Humano (MetaHIT) foi lançado em 2008 pela Comissão Europeia e da China. (Belizário & Napolitano, 2015)





#### 4. Técnicas de estudo do Microbioma Humano

Anton Van Leeuwenhoek (figura 4) conseguiu pela primeira vez, ver e descrever microrganismos através dos microscópios que construiu. Este aparelho com resolução de 1mm era constituído por uma simples lente biconvexa, capaz de ampliar 200 vezes. Através deste conseguiu observar microrganismos da água, saliva, fezes e de outros produtos aos quais chamou animacules. (Ferreira, Sousa, & Lima, 2010) O estudo da diversidade do microbioma humano teve início na década de 1680 quando Anton comparou o microbiota oral e fecal e verificou que os microrganismos variam de local para local e em estado de saúde ou doença. (Ursell, Metcalf, Laura, & Knight, 2012)



Figura 4- Anton Van Leeuwenhoek (Retirado de (Ferreira, Sousa, & Lima, 2010))

A partir do final de 1900, quando Robert Koch desenvolveu métodos de isolamento, o cultivo e o isolamento de bactérias foram técnicas usadas para identificação e caracterização dos microrganismos. A identificação de células bacterianas é possível através do uso de coloração, culturas de enriquecimento e, além disso, através da observação da morfologia e cor das colónias de células, (Grice & Segre, *The Human Microbiome: Our Second Genome*, 2012) promovendo assim a sua identificação visual e característica de cada espécie. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

No entanto, em vários estudos verificou-se que a diversidade e o número de microrganismos era maior do que os que foram identificados, concluindo-se que não é possível cultivar todas as espécies existentes. (Grice & Segre, *The Human Microbiome: Our Second Genome*, 2012) Portanto, há que ter em conta que muitas bactérias não podem ser cultivadas e caracterizadas fenotipicamente ou por falta de condições favoráveis ou porque são de crescimento lento, identificando-se só as espécies mais dominantes. Deste modo, não é difícil compreender que algumas bactérias não crescem

em condições artificiais *in vitro*, pois em condições naturais existem as condições ótimas de crescimento tal como nutrientes, fatores de crescimento, moléculas de sinalização, pressão de O<sub>2</sub> e outras condições físico-químicas, assim como relações simbióticas entre organismos que necessitam uns dos outros para o seu crescimento. Para estas bactérias serem cultivadas em laboratório é então necessário produzir-se as condições necessárias. A incapacidade de cultura de muitos microrganismos levou ao constrangimento de muitos cientistas. (Hollister, Gao, & Versalovic, 2014) No entanto, a capacidade de estudar o microbioma humano tem aumentado devido ao desenvolvimento de novas técnicas analíticas e de sequenciação (ferramentas genómicas, metagenómicas, de sequenciação e bioinformáticas) (Ursell, Metcalf, Parfrey, & Knight, 2012) baseadas no gene 16S rRNA. (Grice & Segre, *The Human Microbiome: Our Second Genome*, 2012)

Estes avanços nos métodos experimentais e no desenvolvimento de ferramentas informáticas têm permitido compreender melhor as alterações das comunidades microbianas. Estas alterações tanto da composição como da abundância de microrganismos têm sido associadas ao estado de doença e de saúde do ser humano. (Bikel, et al., 2015)

No entanto, é necessário ter em conta o custo e a prática destas técnicas, pois algumas são muito caras para serem usadas em rotina no diagnóstico de infeções. Contudo, a generalização dos ensaios moleculares na forma de kits é relativamente acessível e tem como benefício o acesso a uma rápida avaliação individual e personalizada. A ampla utilização destes kits aumentam a possibilidade de coerência entre estudos independentes. (Hiyari & Bennett, 2011)

Os objectivos do estudo do microbioma humano consistem na análise da estrutura e da dinâmica das comunidades microbianas, as relações entre si e o potencial destas na saúde e na doença. (Bikel, et al., 2015)

#### 4.1 Diversidade taxonómica molecular

##### 4.1.1 Gene marcador 16S rRNA

Um marcador é uma sequência de DNA que identifica o genoma pelo qual é constituído, sem a necessidade de o sequenciar na sua totalidade. Apesar de poderem ser usados marcadores diferentes para análise de comunidades distintas, há várias características que definem um bom marcador. Um marcador deve estar presente em todos os membros da comunidade e deve diferir sempre e apenas quando os genomas são distintos entre os indivíduos. O marcador mais usado é o gene 16S rRNA (designação após transcrição), podendo denominar-se também de 16S rDNA. (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012)

A menor subunidade do ribossoma do procariota é constituída pelo gene 16S rRNA e por vinte e uma proteínas ribossomais, (Ferreira, Sousa, & Lima, 2010) sendo que desta forma, este gene é usado como marcador genético bacteriano no estudo filogenético e taxonómico. (Bikel, et al., 2015) Algumas regiões do gene 16S rRNA são conservadas durante a transcrição (Cox, Cookson, & Moffatt, 2013) pelo que podem ser usadas para desenhar primers de amplificação. (Mizrahi-Man, Davenport, & Gilad, 2013) Além disso, contém cerca de 1.500 pares de base de comprimento pelo que o tamanho é suficiente para fins informáticos (Mizrahi-Man, Davenport, & Gilad, 2013) e as regiões hipervariáveis (V1-V9), (Grice & Segre, The Human Microbiome: Our Second Genome, 2012) favorecem a discriminação entre taxonomias. (Cox, Cookson, & Moffatt, 2013) Este gene contém múltiplas operações, sendo a sua sequência usada na identificação e quantificação de bactérias. (Bikel, et al., 2015) A identificação depende de dois parâmetros: introdução das sequências dos nucleótidos em base de dados pública ou privada e a identificação específica de cada sequência. (Mizrahi-Man, Davenport, & Gilad, 2013)

O uso do gene 16S rRNA como molécula de identificação foi a base de desenvolvimento de muitas técnicas moleculares. As novas tecnologias de sequenciação têm permitido caracterizar os microrganismos e verificar o contributo da variabilidade do microbioma para a saúde. (Parfrey & Knight, 2012)

Em Fevereiro de 2012, havia 2 milhões de sequências de 16S rRNA e 35 filas no Projeto de Banco de Dados Ribossomal. No entanto, estes dados filogenéticos são uma

base de dados de referência. (Grice & Segre, *The Human Microbiome: Our Second Genome*, 2012)

#### 4.1.1.1 Sequenciação do gene 16S rRNA

O fato deste gene ser conservado permite a sua utilização para a criação de árvores e de relações filogenéticas. No entanto existem vários métodos que são usados para analisar o gene 16S rRNA, sendo um deles o PCR, uma técnica de amplificação. (Cox, Cookson, & Moffatt, 2013)

PCR ou reação em cadeia da Polimerase é uma técnica de biologia molecular que consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos e que através de várias etapas de variação de temperatura promove a duplicação de cadeias de DNA in vitro. A primeira etapa é a desnaturação (90-97 °C) em que ocorre separação das cadeias de DNA a elevadas temperaturas. A segunda etapa é o “anealing” ou hibridização, que ocorre a uma temperatura mais baixa (50-60 °C) e que consiste na ligação dos primers. E a terceira etapa é a extensão ou polimerização (72 °C). Para a execução do PCR usa-se um termociclador, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo, sendo que geralmente são realizados 30 ciclos. (Joshi & J.D., 2010)

No PCR, para a amplificação do ADN é necessário quatro nucleotídeos deste, primers (sequências iniciadoras) e uma enzima DNA polimerase termoestável. (Joshi & J.D., 2010) Como demonstra a figura 5, os primers usados dependem da bactéria em estudo. (Bikel, et al., 2015)

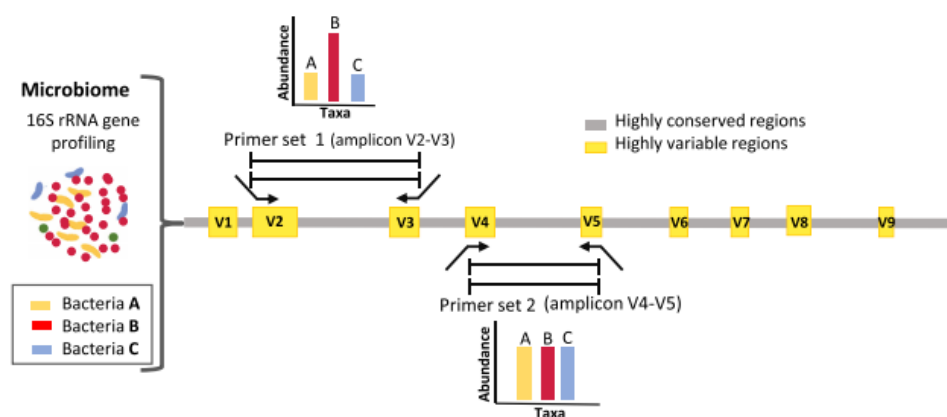


Figura 5 – Escolha dos Primers na amplificação das regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA (Retirado de (Bikel, et al., 2015)) – Esta imagem pretende demonstrar que a escolha dos primers depende das

espécies bacterianas que se pretende amplificar. Na figura estão representadas 3 espécies bacterianas e dois primers diferentes. O primer 1 permitiu uma amplificação diversificada tal como acontece no microbioma humano, enquanto que com o primer 2 isso não aconteceu. Ou seja, o primer 1 permite uma melhor identificação da espécie bacteriana B do que o primer 2.

De uma forma mais completa e resumida, as fases desta técnica são:

- Extração da amostra de DNA;
- Purificação do DNA;
- Prepação da mistura Master Mix;
- Incubação no termociclador;
- Electroforese (técnica finger printing usada para visualização dos genes amplificados);
- Revelação e fixação do gel. (MacIntyre, et al., 2015)

No PCR pode acontecer contaminação microbiana dos reagentes, afetando desta forma os resultados. (Bikel, et al., 2015)) Além disso, PCR pode ainda dividir-se em: PCR Multiplex, Nested PCR, RT-PCR, qPCR, PCR digital.

Uma das limitações da técnica de PCR é o fato dos primers poderem ser desenhados a favor ou contra determinados grupos de organismos. Erros de PCR são comuns e difíceis de detetar. (Bikel, et al., 2015)

O gene inteiro ou as regiões hipervariáveis podem ser amplificadas, sendo o produto do pcr sequenciado e comparado com a base de dados que contem as espécies conhecidas.

Além da sequenciação do gene 16S rRNA existe ainda a metagenómica que permite não só identificar o microrganismo mas também interpretar a sua função. (Grice & Segre, *The Human Microbiome: Our Second Genome*, 2012) No entanto, a sequenciação metatranscriptómica vem complementar as limitações da metagenómica, possibilitando o acesso ao metatranscriptoma de todo o genoma microbiano.

Em poucos estudos foi usada a combinação das duas técnicas: metatranscriptómica e metagenómica. Na técnica metatranscriptómica isola-se o RNA (obtido através de transcrição reversa) total do microbioma e procede-se ao seu enriquecimento. De

seguida, este é sujeito a fragmentação e sintetiza-se DNA através da utilização da transcriptase reversa e hexâmeros aleatórios. De seguida o DNA é reparado e amplificado. (Bikel, et al., 2015)

Em bioinformática, para analisar amplificações do gene 16S rRNA são usados softwares: Qiime, Mothur, Migrast e Galaxy. QIIME e Mothur são softwares informáticos que se baseiam na análise de sequências de uma comunidade. O software é baseado em dados anteriores de sequenciação. Estes servem para descrever  $\alpha$  e  $\beta$  diversidade. (Schloss, et al., 2009)

#### 4.1.2 Sequências em OTUs

A definição precisa de uma única sequência é um grande desafio que se coloca bioinformaticamente. Apesar do gene 16S rRNA apresentar regiões conservadas, existem regiões que são hipervariáveis, pelo que um pequeno número de pares de base podem sofrer modificação num espaço curto de tempo. Algum grau de divergência na sequência é aceitável (ex: 95%, 97%, 99%), pois o genoma é praticamente idêntico, pelo que se denomina de unidade operacional taxonómica (OTU). (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012) Por outras palavras, OTU representa um conjunto de microrganismos que contém sequências que são semelhantes entre si. (Schloss & Westcott, Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence Analysis, 2011)

##### 4.1.2.1 Diversidade populacional

A medição da diversidade é de grande importância para a saúde humana pois casos de doença têm sido relacionados com a diminuição da diversidade do microbioma. Muitos microrganismos encontram-se abundantemente em alguns indivíduos e muitos predominam entre a maioria destes, mas nenhum microrganismo é universal.

O estudo bioinformático da diversidade do microbioma humano é muito complexo pelo que foi avaliado pelo HMP através das unidades taxonómicas operacionais (OTUs). (Morgan, Segata, & Huttenhower, 2012) A figura 6 demonstra como é feita a análise de OTUs.

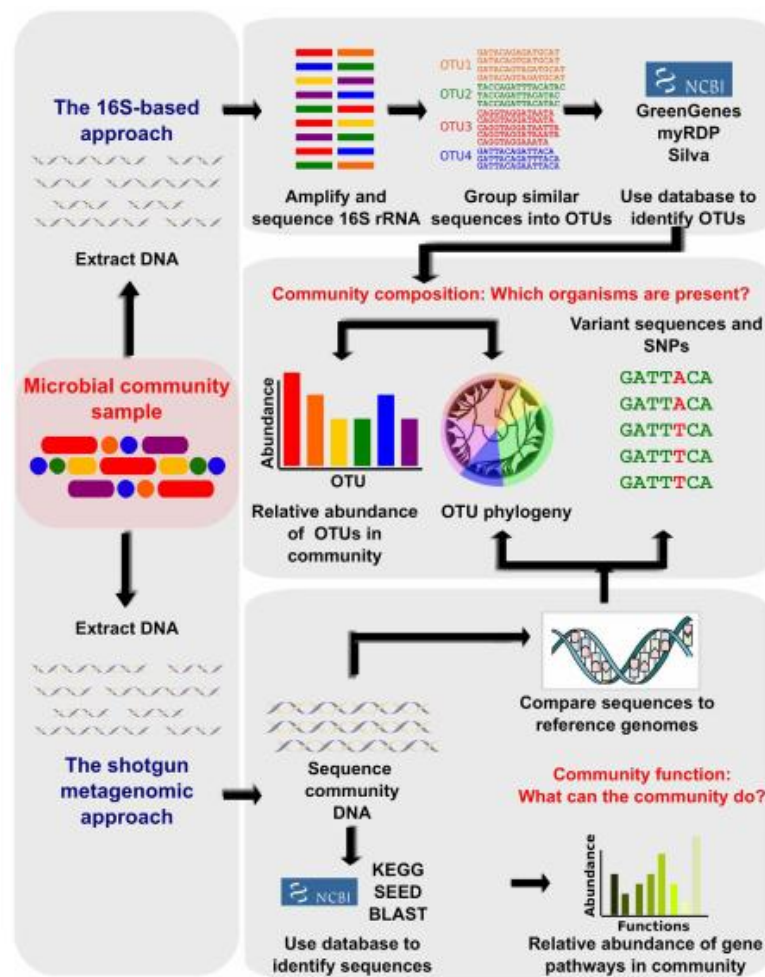


Figura 6- A metagenômica e métodos bioinformáticos. (Retirado de (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012)) – Numa primeira fase, procede-se à extração da amostra de DNA. Através da amplificação e sequenciação do gene 16S rRNA consegue-se definir a taxa bacteriana presente na população. Posteriormente as sequências semelhantes são agrupadas em OTUs, e sofrem comparação com bases de dados (ex: Genes Verde, myRDP, Silva,...) com a finalidade de identificar os OTUs com grande precisão. A composição da comunidade pode ser descrita através da menção dos OTUs presentes, a sua abundância relativa e/ou respectiva filogenética.

Por outro lado, está representado a metagenômica, em que as sequências de DNA da comunidade são comparadas com genomas de referência ou catálogos de genes. Esta técnica apresenta um maior custo mas permite uma melhor resolução taxonômica e a observação do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs) e de outras sequências variantes. Além da composição, a metagenômica permite também a investigação das capacidades funcionais da comunidade bacteriana, através da comparação das respectivas sequências de DNA com bases de dados (ex: KEGG, SEED, BLAST,...) de modo a identificar as sequências.



A diversidade  $\alpha$  corresponde ao número de espécies presentes numa determinada região. Por exemplo a boca é dos microbiomas humanos com maior diversidade  $\alpha$  e a vagina com menor. A diversidade  $\alpha$  é então calculada de acordo com a quantidade e com a distribuição dentro de uma população. (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012) No caso da diversidade  $\beta$  a cavidade oral já tem uma diversidade  $\beta$  menos acentuada, ou seja, embora apresente uma grande diversidade microbiana, geralmente as espécies são conservadas entre indivíduos, (Morgan, Segata, & Huttenhower, 2012) o que significa que a diversidade beta representa uma medida de similaridade entre populações. (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012)

A diversidade  $\alpha$  é quantificada pelo índice de Shannon e a diversidade  $\beta$  é medida pela dissimilaridade Bray-Curtis. (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012)

Torna-se necessário formar perfis com as composições taxonómicas e filogenéticas das comunidades microbianas para compreender a sua biologia e para a caracterização de doenças complexas como a obesidade ou doença inflamatória do intestino que não parece estar associada apenas a microrganismos individuais. (Segata, et al., 2013)

#### 4.1.3 The shotgun metagenomic

Whole- metagenome shotgun (WMS) refere-se à sequenciação genómica a partir de fragmentos de DNA. (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012)

A sequenciação WMS permite obter perfis de comunidades microbianas a partir do seu DNA. No entanto, nenhum método foi simultaneamente eficaz e preciso devido a limitações informáticas. (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012)

WMS permite não só a compreensão da comunidade bacteriana mas também da sua interação com o hospedeiro. (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012) O microbiota seria uma investigação de interesse se este não fosse influenciado em grande parte pela imunidade do hospedeiro, acabando por ser uma grande influência na saúde e doença do hospedeiro. (Bermon, et al., 2015)

A análise metagenômica filogenética (MetaPhlAn) permite o processamento de milhões de leituras metagenômicas em poucos minutos e obtém com precisão os perfis característicos das comunidades microbianas. Esta análise estima a abundância relativa de microrganismos através de mapeamento de leituras que se obtêm através da pré-seleção informática de pequenas sequências de marcadores específicos. A classificação é realizada através da comparação da leitura metagenômica da amostra com o marcador. (Segata, et al., 2013) Os marcadores específicos de MetaPhlAn são sequências codificadoras que são desenhadas automaticamente na base de dados por computador permitindo uma maior precisão. Estes marcadores satisfazem as seguintes condições:

- São conservados dentro do genoma do organismo;
- Não é similar a outras sequências presentes fora do organismo. (Segata, et al., 2013)

Whole-genome sequencing (WGS) tem como significado a sequenciação do genoma completo. (Segata, et al., 2013)

Após a atribuição de um genoma único do organismo, uma vez definidos os genes do genoma, estes podem ser mapeados ou inseridos na base de dados de referência. (Segata, et al., 2013)

Um dos primeiros ensaios metagenômicos para estudar comunidades sem necessidade de extração de DNA foi a hibridação fluorescente in situ (FISH), em que as sondas específicas para o marcador oligonucleotido sofrem hibridização com a comunidade microbiana. Estas sondas podem ser usadas com quase qualquer uma taxonomia, embora esta técnica tenha sido limitada ao gene marcador 16S rRNA numa fase inicial, para estudos de diversidade e identificação de enzimas específicas. No entanto, continua a ser uma tecnologia baseada em imagem. (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012)

Uma outra análise da estrutura da comunidade pode-se fazer através da utilização de microarray baseado em 16S rRNA. (Morgan & Huttenhower, Chapter 12: Human Microbiome Analysis, 2012)

Na tabela 1 estão representadas vantagens e desvantagens da sequenciação do gene 16S rRNA:

Método Molecular	Vantagens	Desvantagens
Sequenciação do gene 16S rRNA	-Identificação de espécies não cultiváveis; -Alta capacidade de análise.	-Baixa resolução ao nível da espécie; -Limitada para distinção de novas espécies.

Tabela 1- Vantagens e Desvantagens da Sequenciação do gene 16S rRNA (Adaptado de (Segata, et al., 2013))

#### 4.1.4 Checkerboard DNA–DNA Hybridization

Consiste na hibridização de uma grande quantidade de DNA com sondas deste ácido desoxirribonucléico suportadas numa única membrana. Esta permite a análise de várias amostras em simultâneo e a identificação das várias espécies da amostra (ex: placa dentária). No entanto, é uma técnica que está limitada às bactérias que podem ser cultivadas devido ao uso do genoma completo, contudo isto pode ser contornado através do método “reverse capture checkerboard hybridization” em que se passaram a utilizar primers universais. Esta alteração ao método tradicional permite a hibridização simultânea de 1350 amostras numa só membrana. (Hiyari & Bennett, 2011)

Na tabela 2 estão representadas algumas vantagens e desvantagens desta técnica:

Método Molecular	Vantagens	Desvantagens
Checkboard DNA-DNA Hybridization	-Análise de várias amostras simultaneamente; -Identificação das várias espécies da mesma amostra.	-Limitada às espécies cultiváveis; -Método trabalhoso.

Tabela 2- Vantagens e Desvantagens do Checkboard DNA-DNA Hybridization (Adaptado de (Hiyari & Bennett, 2011))

#### 4.1.5 Desnaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

Esta técnica permite a análise das comunidades bacterianas através da associação do PCR com a electroforese. Consiste na amplificação de vários marcadores genéticos, inclusivé o gene 16S rRNA, e análise posterior num gel desnaturante. Cada banda visualizada no gel representa uma população bacteriana e estas podem ser recortadas individualmente para realizar a sequenciação e a análise das espécies presentes. O número de bandas presentes no gel reflete a diversidade de microrganismos na amostra e a sua intensidade reflete a abundância. (Piterina & Pembroke, 2013)

Na tabela 3 estão representadas algumas vantagens e desvantagens desta técnica:

Método Molecular	Vantagens	Desvantagens
DGGE	-Cada banda representa uma população bacteriana diferente; -Mostra abundância das espécies.	-Dificuldade na obtenção de resultados reprodutíveis; -Muitas sequências bacterianas podem migrar para outras bandas.

Tabela 3- Vantagens e Desvantagens do DGGE (Adaptado de (Piterina & Pembroke, 2013))

#### 4.1.6 Pirosequenciação

Método rápido de sequenciação genética que usa uma série de enzimas que detetam eficazmente os nucleótidos sequenciados durante o processo de síntese. Este permite identificar microrganismos e detetar resistência a antibióticos simultaneamente. Além disso, é uma técnica barata que exclui a preparação de bibliotecas de clones. (Ling, et al., 2013)

Pyrosequencing Barcoded utiliza técnicas moleculares barcoding. Sequências em cada amostra são marcados com um código de barras único. (Ling, et al., 2013)

#### 4.1.7 Viroma

O DNA viral representa apenas 0.1% do DNA total do microbioma humano, apesar de existirem dez vezes mais vírus do que células microbianas na maioria dos ambientes. PHACS é uma ferramenta bioinformática para avaliar a biodiversidade de comunidades virais não cultivados. (Bikel, et al., 2015)

Estudos recentes revelam que a composição e abundância de bactérias tem sofrido alterações e tem havido um aumento do vírus bacteriófagos e não do vírus eucarióticos. (Bikel, et al., 2015)

Os bacteriófagos (fagos) são vírus com ação antibacteriana pois promovem a lise das bactérias ou oferecem benefícios ao seu hospedeiro. Foi demonstrado que fagos podem acelerar a evolução genômica do microbioma do hospedeiro, levando a adaptações funcionais da comunidade bacteriana. Fagos também fazem parte do microbioma humano. Estes podem ser ativados devido à dieta ou a hábitos, o que sugere que a relação bactéria-virus pode estar presente na obesidade ou diabetes por exemplo. (Bikel, et al., 2015)

O mecanismo de CRISPR contribui na interação das bactérias e vírus no microbioma. Pensa-se que o estudo virômico e metagenômico antes e após o tratamento com probióticos seja um método eficaz para estudar a dinâmica da comunidade microbiana intestinal. O estudo virômico tem sido importante para perceber o envolvimento do vírus na disbiose microbiana. Outro fator que promove a disbiose é a presença de bacteriófagos. (Bikel, et al., 2015)

Estudos metagenômicos combinados com estudo metatranscriptômicos permitem estudar as relações entre os microrganismos no microbioma humano. (Bikel, et al., 2015)

Nos estudos do microbioma em seres humanos, a dieta, antibióticos, IMC, idade, gravidez, etnicidade são fatores que influenciam em diferentes graus (ver figura 7) a composição da flora intestinal e de outros locais do corpo. (Bikel, et al., 2015)

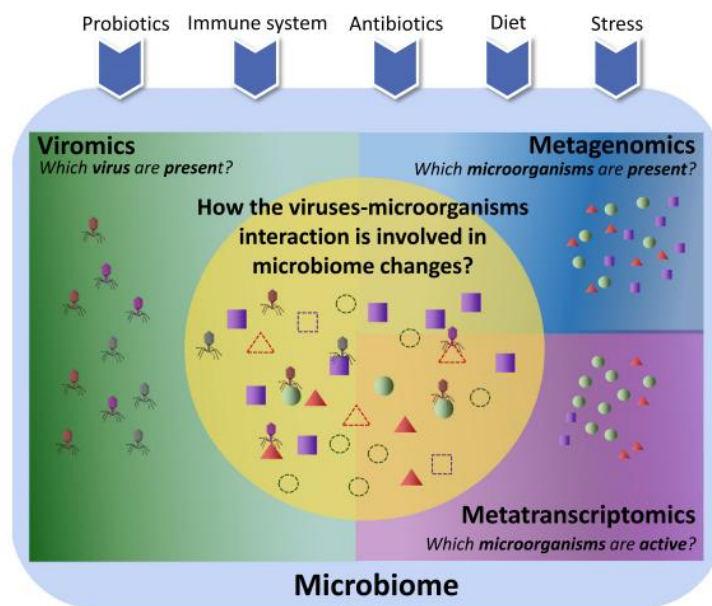


Figura 7– Análise do Microbioma Humano. (Retirado de (Bikel, et al., 2015)) – Esta imagem representa a importância do uso das três técnicas de análise do microbioma humano para o estudo completo deste. A combinação destas permite não só identificar os microrganismos mas também a sua ação e além disso, perceber a função dos vírus no microbioma. Esta combinação permite ainda a compreensão do papel de fatores externos tal como a dieta, antibióticos, stress, sistema imunológico e probióticos na formação do microbioma humano.

A figura 8 resume algumas das técnicas de análise do microbioma.

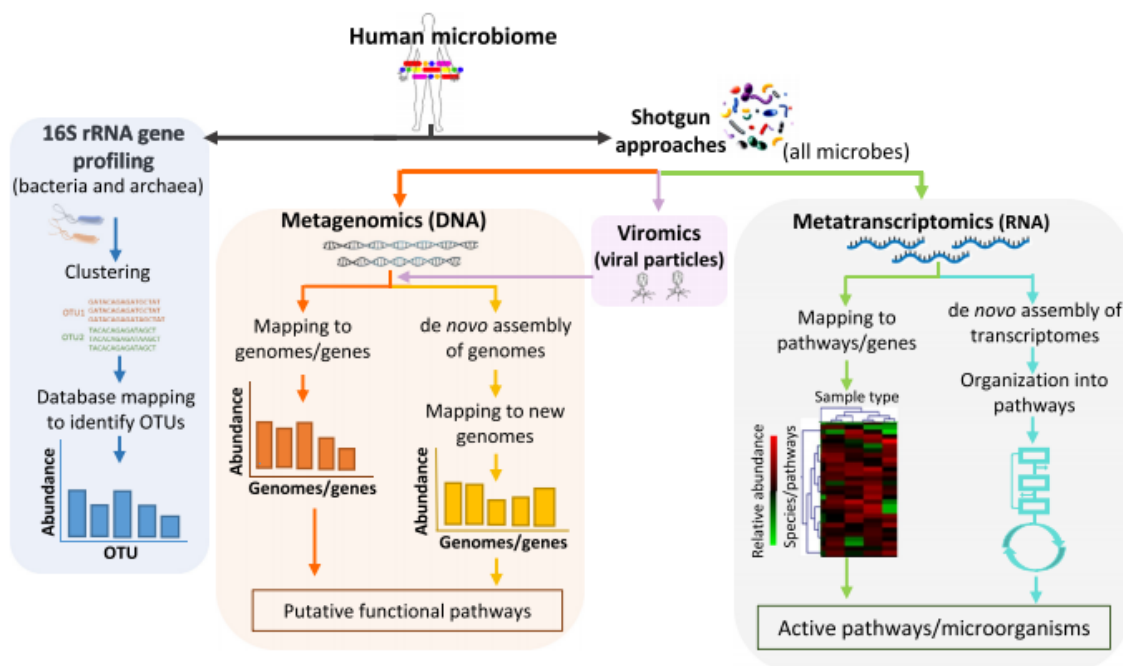


Figura 8– Análise do microbioma humano através de sequenciação e estratégias bioinformáticas. (Retirado de (Bikel, et al., 2015)) – Para estudar a comunidade microbiana existem técnicas de alto rendimento tal como “16S gene profiling” que se baseia na sequenciação das regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA e “Shotgun approaches” que se baseia na sequenciação do DNA total (metagenoma) e/ou do RNA total (metatranscriptoma). Além disso, pode-se ainda analisar o viroma através da sequenciação de todas as partículas virais.

Na última década, a sequenciação do gene 16S rRNA tem sido usada para identificar a abundância e a diversidade de bactérias na amostra.

A metagenômica além de identificar a abundância e a diversidade microbiana, identifica também o conteúdo genético. Na análise metagenômica, sequências de DNA podem ser mapeadas de modo a formar referência de genomas. A abundância de genomas e o potencial funcional das sequências pode ser avaliado através de bases de dados.

Na análise virômica, as partículas virais devem ser enriquecidas e de seguida sequenciadas de modo a obter-se o genoma viral.

Na análise metatranscriptômica as sequências de RNA obtidas são mapeadas. O conjunto novo de genomas e transcriptomas pode servir para identificar novos genomas.

### 5. Microbioma humano

O microbioma humano apresenta uma relação simbiótica ou comensal com o hospedeiro, ou seja, beneficia o hospedeiro ou não confere benefício nem prejuízo, respectivamente. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) A figura 9 representa a diversidade do microbioma e a sua variação de acordo com a região corporal, pelo que através desta podemos concluir que a espécie predominante na vagina é *Lactobacillus* e que os filos Bacteroidetes e Firmicutes são os mais representantes no intestino, por exemplo. (Grice & Segre, *The Human Microbiome: Our Second Genome*, 2012)

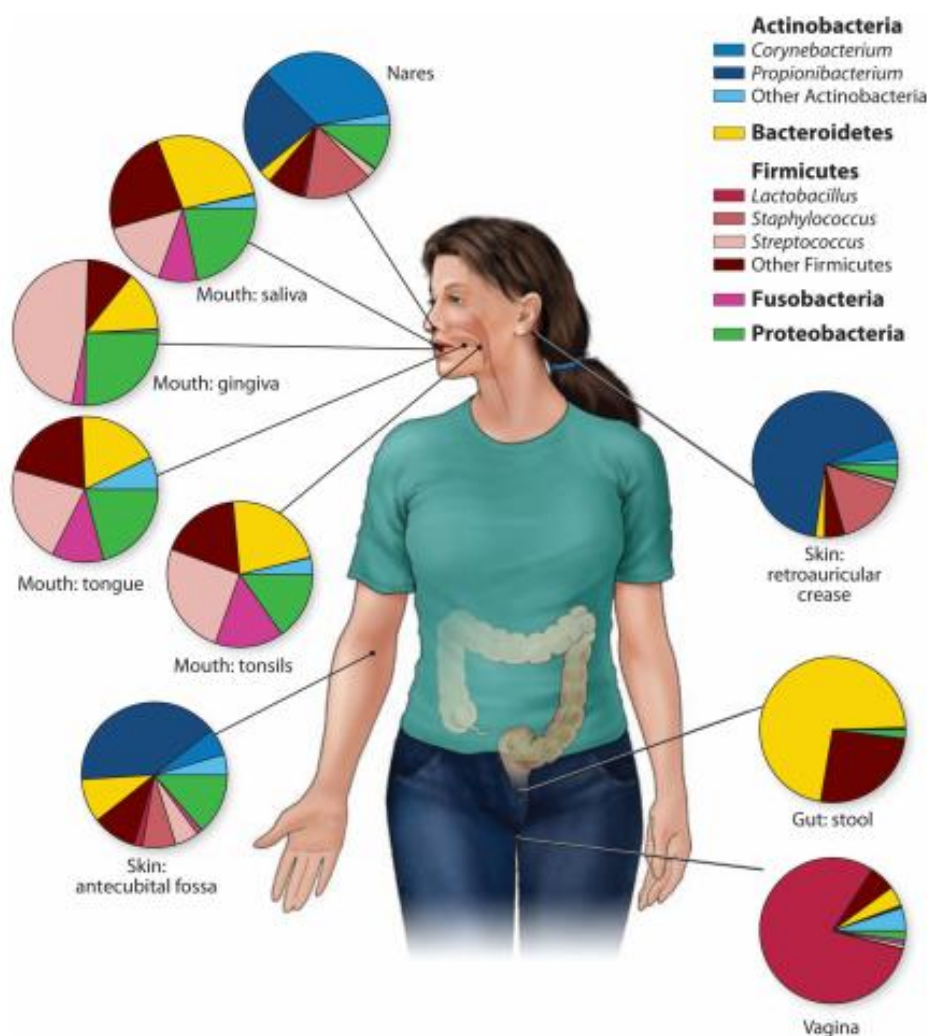


Figura 9– Microbioma humano comensal (Retirado de (Grice & Segre, *The Human Microbiome: Our Second Genome*, 2012)) – Esta imagem pretende mostrar que a diversidade depende da região corporal e que além disso existem locais que são mais semelhantes entre indivíduos tal como a boca. Esta imagem



foi dividida nas 5 filos mais predominantes (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria e Proteobacteria), dando exemplo de algumas espécies representantes de cada um.

O microbiota reflete a idade, o estado nutricional e o meio ambiente onde o individuo vive. Os órgãos internos são estéreis, sendo apenas os órgãos externos colonizados durante o nascimento, como vimos anteriormente. (Barroso, Melo-Silvestre, & Taveira, 2014)

A imagem seguinte (figura 10) demonstra a diversidade microbiana presente no ser humano e a sua abundância.

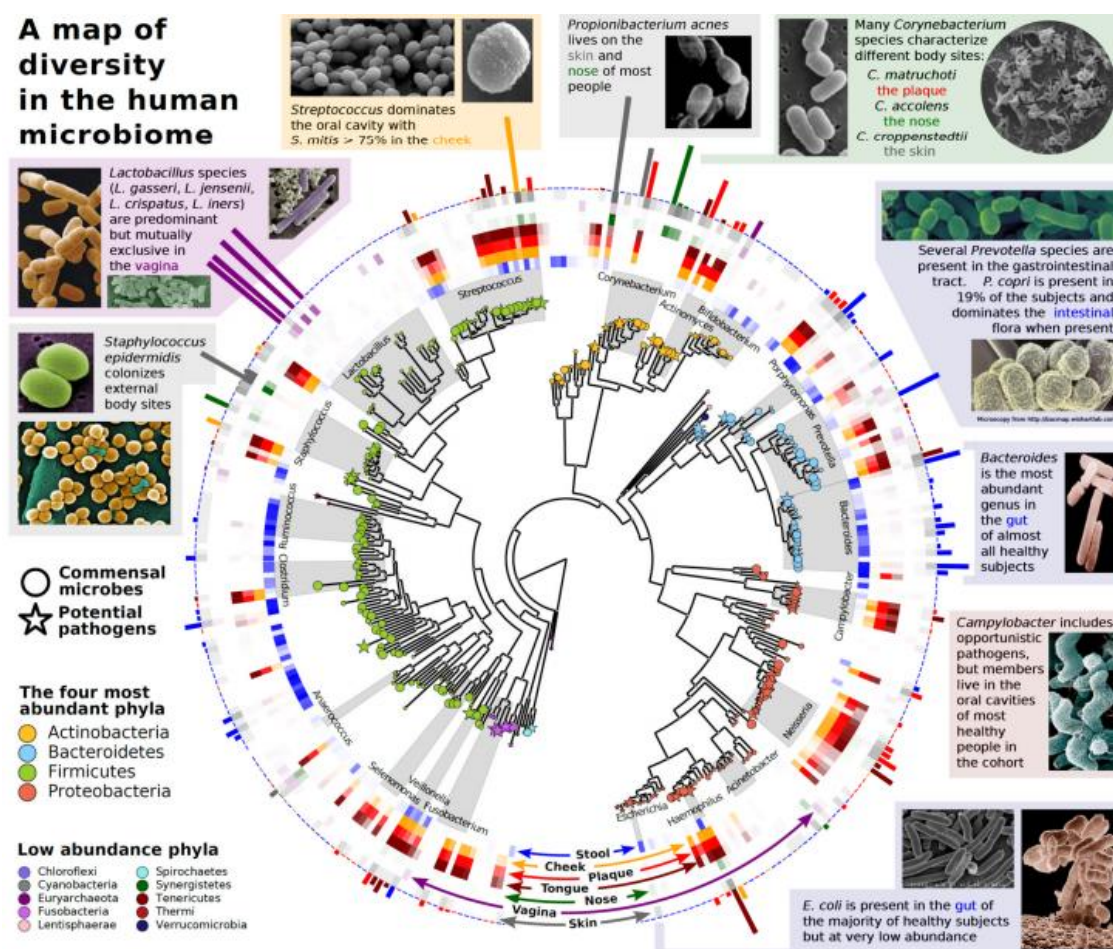


Figura 10- Mapa da diversidade microbiana. (Retirado de (Morgan, Segata, & Huttenhower, 2012))- Na parte central está representada uma árvore filogenética dos microrganismos mais abundantes do microbioma humano. As barras laterais exteriores ao círculo são proporcionais à taxa de abundância na região corporal predominante.

Nesta dissertação, iremos analisar o microbioma da cavidade oral, da pele, do trato urogenital e do trato gastrointestinal.

### 5.1 Cavidade Oral

A Cavidade oral é muito complexa e apresenta uma grande diversidade bacteriana. Esta é dividida em partes (língua, dentes, mucosa, céu da boca e gengivas) e todas elas contém uma composição específica de microrganismos. É uma grande porta de entrada do corpo humano, provocando doenças infecciosas orais neste, tal como cáries, periodontites, gengivites, entre outras. (Dewhirst, et al., 2010) A comunidade bacteriana presente na periodontite ou cárie é maioritariamente complexa e composta por bactérias anaeróbias gram<sup>-</sup> tal como *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Agregatibacter actinomycetemcomitans*. (Belizário & Napolitano, 2015)

O microbioma oral tem sido estudado através de cultivo e através de técnicas moleculares (ex: clonagem do gene 16S rRNA), pois apenas algumas espécies são possíveis de colonizar. Como exemplo de uma forma de estudo do microbioma oral, numa fase inicial extrai-se uma amostra de DNA. Esta pode ser feita com um cotonete de nylon e pode ser usado o kit de isolamento de DNA microbiano UltraClean a partir de bactérias Gram<sup>+</sup>. De seguida procede-se ao PCR, usando primers universais para amplificar o gene. Realizam-se cerca de 30 ciclos e de seguida observa-se o produto amplificado num gel de electroforese a 1% corado com SYBR e visualiza-se posteriormente a UV. Depois de se visualizar que o tamanho certo foi amplificado, é usado um kit de extração de gel da Qiagen para retirar parte do gel. (Dewhirst, et al., 2010)

Foram identificados mais de 300 géneros, pertencentes a mais de 20 filos de bactérias. (Belizário & Napolitano, 2015) O filo Tenericutes foi separado recentemente do filo Firmicutes. A espécie *Mycoplasma* foi detectada na saliva de 97% de indivíduos. (Dewhirst, et al., 2010)

Os microrganismos presentes no sulco gengival são predominantemente anaeróbicos. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) Na figura 11 pode-se visualizar os géneros presentes na cavidade oral e respectiva abundância.

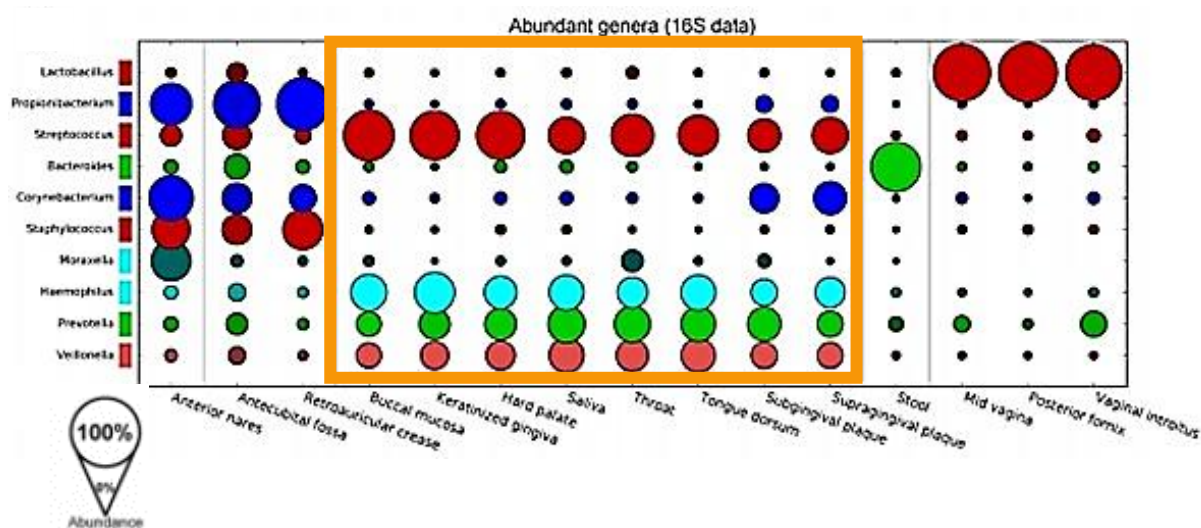


Figura 11- Representação colorimétrica dos géneros bacterianos obtidos através da análise do gene 16S rRNA e respectiva abundância. (The Human Microbiome Project Consortium, 2013) – Na imagem, os géneros presentes na cavidade oral encontram-se circundados com um retângulo laranja. Encontram-se divididos por zonas e o tamanho das bolas representam a abundância dos respectivos géneros. Como exemplo temos *Streptococcus* que se destaca na cavidade oral.

À superfície dos dentes pode haver formação de biofilmes. A formação desta biopelícula consta de 3 etapas: fixação, colonização e desenvolvimento. Algumas bactérias como *Streptococcus mutans*, pertencente ao grupo viridans, ao fermentar os açúcares produz ácidos que podem corroer o esmalte dentário. Quando não se efetua regularmente a higiene dentária, poderá haver uma acumulação de biofilmes levando a cáries dentárias. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) Estas são consideradas a patologia infecciosa mais prevalente em todo o mundo afetando, segundo a OMS, entre 60% a 90% da população escolar e a maioria dos adultos.

De acordo com a informação anterior, a higiene oral e a queda dos dentes podem afetar a flora gastrointestinal e o estado nutricional, podendo levar ao desenvolvimento de doenças crónicas, tal como doenças do trato digestivo, incluindo cancro oral, gástrico e esofágico. Vários estudos sugerem que a placa dentária é um reservatório de *Helicobacter Pilory*. Portanto, um maior conhecimento do microbioma bucal e das inter-relações dos microrganismos que habitam é fundamental não só a nível de problemas da boca mas também a nível do aparelho digestivo e cardiovascular que são influenciados pelo ecossistema oral.

A complexidade da comunidade bacteriana da placa dentária tem dificultado a determinação de um único agente responsável pelas cáries, devido ao facto em que nestes problemas, estão presentes outros fatores como a dieta, educação, hábitos de higiene, sendo multifatorial. *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans* são considerados os maiores agentes etiológicos da cárie dentária, do que *S.mutans* apenas. (Oda, Hayashi, & Okada, 2015)

Na língua e na saliva, predominam as espécies do grupo *Streptococcus viridans*. No entanto, encontram-se também outros microrganismos tal como *Fusobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Veillonella sp.*, *Bacteroides sp.*, *Actinomyces sp.*, *Treponema sp.* e leveduras como *Candida sp.* por exemplo. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

Existem cerca de 75% de *Streptococcus mitis* na cavidade oral, sendo esta a espécie mais dominante. (Morgan, Segata, & Huttenhower, Biodiversity and functional genomics in the human microbiome, 2012)

## 5.2 Pele

A Pele é o maior órgão do corpo humano com principal função de barreira protetora contra a colonização de microrganismos. Este órgão está diariamente em contacto com uma infinidade de microrganismos, mas devido ao seu pH ácido de 5.6 impede a sobrevivência destes. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

As principais espécies bacterianas presentes na pele são Gram<sup>+</sup>. *Staphylococcus epidermidis* é a espécie aeróbia comensal mais comum e constitui quase 100% da comunidade bacteriana. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) Esta espécie pode-se tornar patogénica quando invade outras regiões. É considerada a causa mais frequente de infeções nosocomiais adquirida através de dispositivos médicos (ex: cateteres). Após a invasão destes microrganismos, pode haver formação de biofilmes protegendo desta forma estes microrganismos das respostas imunes do hospedeiro e de antibióticos, particularmente da oxacilina e metacilina. (Grice & Segre, The skin microbiome, 2011) Por outro lado, *Staphylococcus aureus* está presente em cerca de 15-25% dos indivíduos e predomina em regiões húmidas. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

A colonização da pele depende da fisiologia desta. (ver figura 12) Há relativamente mais microrganismos nos folículos pilosos que na pele. (Grice & Segre, The skin microbiome, 2011) A densidade de microrganismos também é maior abaixo da cintura (trato gastrointestinal e geniturinário). (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) Através de análise genômica foi permitido visualizar que *Staphylococcus* e *Corynebacterium spp.* são microrganismos predominantes em áreas húmidas (umbigo, axilas, virilhas, zona posterior do joelho, zona interna do cotovelo). (Grice & Segre, The skin microbiome, 2011)

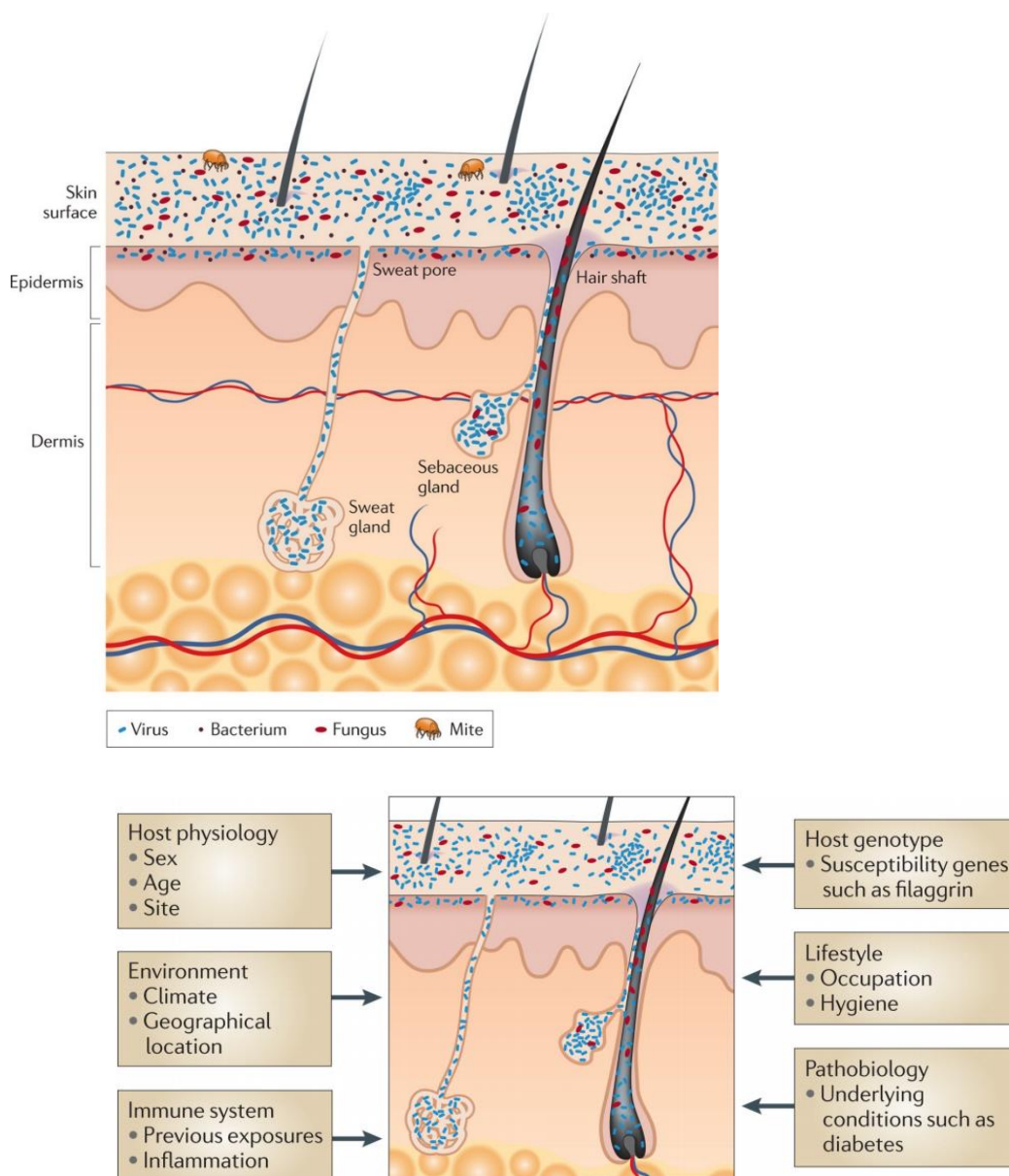


Figura 12– Fatores que favorecem alterações no microbioma da pele. (Retirado de (Grice & Segre, The skin microbiome, 2011))



Geralmente, a diversidade é menor em áreas sebáceas. *Propionibacterium spp.* são os microrganismos dominantes nestas e noutras áreas sebáceas. (Grice & Segre, The skin microbiome, 2011) As regiões que apresentam maior diversidade (Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes) são áreas secas (antebraço, nádega, várias partes da mão). (ver figura 13)

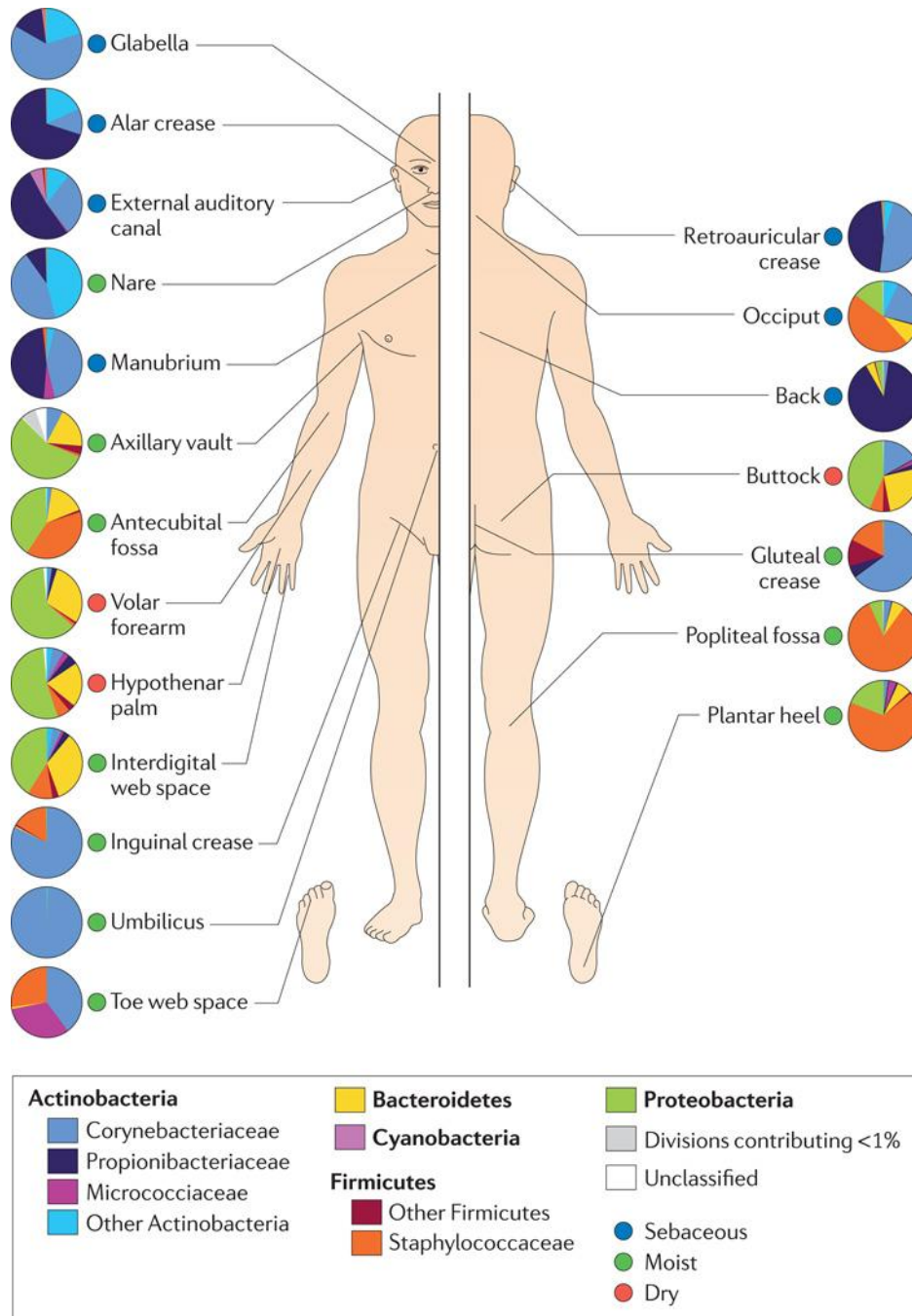


Figura 13– Distribuição dos microrganismos na pele. (Retirado de (Grice & Segre, The skin microbiome, 2011)) – A colonização pelos microrganismos faz-se de acordo com o microambiente. Esta

imagem encontra-se dividida por três microambientes: Sebáceo (bola azul), Húmido (bola verde) e Seco (bola laranja).

A acne é um processo inflamatório que ocorre nos folículos sebáceos em cerca de 90% dos adolescentes e adultos jovens, sendo visível principalmente na face, pescoço e costas, deixando por vezes cicatrizes irreversíveis. Estas mudanças que ocorrem na pele levam à proliferação de *Propionibacterium acnes* (bacilo anaeróbio gram-positivo) nos folículos pilosos e nas glândulas sudoríparas e sebáceas. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) A bactéria comensal *Propionibacterium acnes* poderá estar associada a doença inflamatória pilosebácea. (Grice & Segre, The skin microbiome, 2011)

A dermatite seborreica é uma doença hiperproliferativa da pele que afeta tipicamente o couro cabeludo. Verificam-se melhorias quando se verificam níveis reduzidos de *Malassezia spp.* A maioria das doenças de pele são tratadas com antimicrobianos, embora neste caso seja necessário um fungicida pois domina a levedura *Malassezia spp.*. (Grice & Segre, The skin microbiome, 2011)

Ainda presentes na pele mas em menor quantidade temos *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Clostridium*. Leveduras como *Candida* e *Malassezia* podem ser encontrados principalmente no couro cabeludo, ao redor das unhas e entre os dedos dos pés. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

### 5.3 Trato Urogenital

O trato urinário e o trato genital superior são estéreis. No trato urogenital, somente a uretra e a vagina estão permanentemente colonizados. A uretra é pouco colonizada, fazendo parte da sua constituição *Staphylococcus* coagulase negativa como *S. epidermidis*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) Na maioria das mulheres asiáticas saudáveis predomina *Lactobacillus*, ao contrário do que acontece com mulheres hispânicas e negras. Nestas últimas, há uma prevalência de bactérias anaeróbias e são dominadas mais frequentemente por *Lactobacillus iners* quando *Lactobacillus spp.* está presente. (Ma, Forney, & Ravel, 2012)

No entanto, pode haver colonização transitória por microrganismos fecais como enterobactérias, podendo conduzir à invasão e infecção do trato urinário superior. Por outro lado, a vagina apresenta uma grande diversidade microbiana que sofre alterações devido à idade e fatores hormonais. Estas alterações verificam-se na puberdade, no período fértil, na gravidez, no pós-parto e na menopausa. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

Antes da puberdade, a vagina é constituída maioritariamente por *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* e bacilos difteroides. Quando a rapariga atinge a puberdade verifica-se o início da produção de estrogénios, o que faz com que *Lactobacillus sp.* (bacilos Doderlein) seja a espécie predominante. O nível de estrogénios provoca proliferação do epitélio vaginal com produção de glicogénio. Este é metabolizado por *Lactobacillus* originando ácido láctico, o qual é responsável pelo pH ácido da vagina (3.8- 4.5). O pH ácido impede a proliferação de microrganismos potencialmente patogénicos não resistentes a este tipo de meios. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) O ácido láctico não peróxido de hidrogénio apresenta assim, um papel protector vaginal. (Ma, Forney, & Ravel, 2012) Quando o pH se torna mais básico, devido a desequilíbrios da microbiota vaginal (ex: antibioterapia), ocorre sobrecrecimento de outras bactérias e leveduras podendo originar vaginites por exemplo. Além de *Lactobacillus*, existe ainda *Staphylococcus sp.* incluindo *S.aureus*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, enterobactérias, *Candida sp.*, *Mycoplasma sp.*, *Gardnerella vaginalis* e outras bactérias anaeróbias, pois como em todas as mucosas, existe uma alta proporção de bactérias anaeróbias. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) A vagina é, portanto, praticamente um ambiente anaeróbico em que os níveis de oxigénio dissolvido são baixos. (Ma, Forney, & Ravel, 2012)

Numa gravidez saudável o microbiota vaginal assemelha-se ao microbiota de uma mulher não grávida, mas com maior abundância de *Lactobacillus*. (DiGiulio, et al., 2015) Ou seja, na gravidez, o microbiota vaginal é composto maioritariamente por uma ou duas espécies de *Lactobacillus*, mantendo-se estável e menos sujeita a variações. *Lactobacillus spp.* é responsável por inibir o crescimento de agentes patogénicos através da secreção de bacteriocinas, bem como através da produção de metabolitos tal como o ácido láctico que promove a manutenção de um pH baixo. (MacIntyre, et al., 2015) Bacteriocinas são substâncias com ação bactericida proteico sintetizado por bactérias de estreito espectro. Esta actividade antimicrobiana pode desempenhar um papel



importante na defesa contra o crescimento de patogénicos e baseia-se na permeabilização da membrana da célula alvo. (Ma, Forney, & Ravel, 2012) No entanto, o microbioma varia de acordo com a etnia da população. Em populações americanas, as comunidades bacterianas vaginais dominantes em mulheres asiáticas e brancas são *Lactobacillus spp.* (*L. crispatus* (CST I), *L. gasseri* (CST II), *L. iners* (CST III), *L. jensenii* (CST V)), enquanto que bactérias anaeróbias (CST IV) (*Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Finegoldia*, e *Mobiluncus*) são mais encontradas em mulheres negras e hispânicas. (MacIntyre, et al., 2015)

A disbiose do microbioma vaginal durante a gravidez, ou seja, a diminuição de *Lactobacillus*, presença de *Gardnerella* ou *Ureaplasma* ou vaginose bacteriana (DiGiulio, et al., 2015) pode levar a complicações, especialmente a um parto prematuro. (MacIntyre, et al., 2015)

Numa perspetiva geral, a comunidade vaginal sofre várias perturbações devido a diversos fatores tal como antibióticos, contraceptivos hormonais e outros métodos contraceptivos, a atividade sexual, lubrificantes vaginais, entre outros. Além disso, há muitos outros fatores intrínsecos, como a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro. O crescimento excessivo de *Gardnerella vaginalis* está associado a vaginose bacteriana. (Ma, Forney, & Ravel, 2012)

A composição do microbioma vaginal muda após o parto, diminuindo *Lactobacillus spp.*, principalmente *L. crispatus*, aumentando a diversidade independentemente da comunidade bacteriana durante a gravidez e da etnia. (ver figura 14) (MacIntyre, et al., 2015) Há então uma diminuição de *Lactobacillus* e um aumento de espécies anaeróbicas tal como *Peptoniphilus*, *Prevotella* e *Anaerococcus*. (DiGiulio, et al., 2015) (ver figura 16) Além disso há uma redução rápida de estrogénio, logo de glicogénio, havendo quebra de produtos utilizados pelas bactérias produtoras de lactato. Durante a primeira semana após o parto, observa-se uma diminuição do nível de estrogénio entre 100 a 1000 vezes. Pensa-se que o estrogénio é responsável pela composição bacteriana durante a gravidez. Na produção da placenta aumenta a quantidade de estrogénio produzido, havendo acumulação de glicogénio e portanto, aumento de *Lactobacillus*. (MacIntyre, et al., 2015)

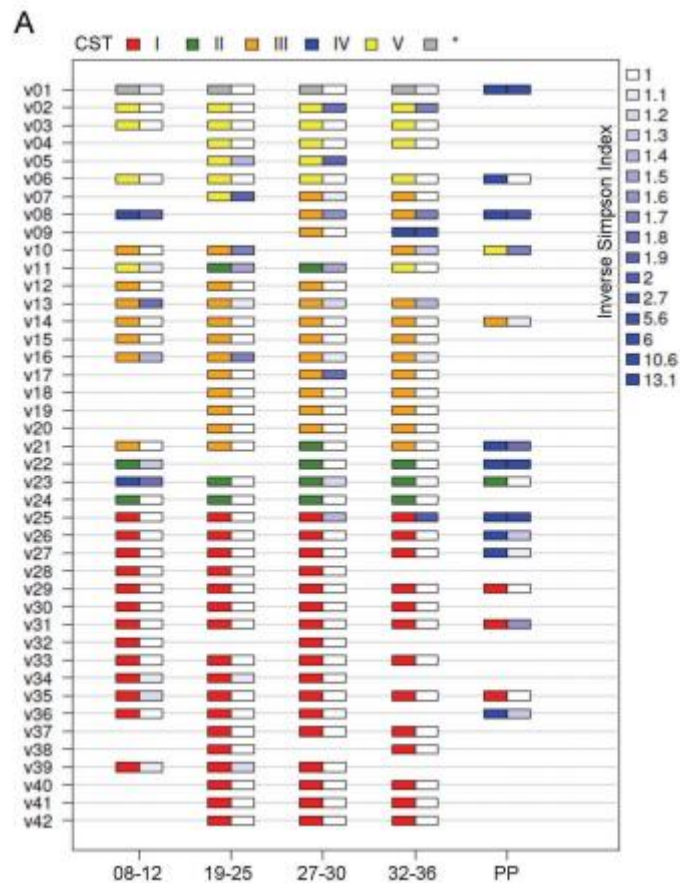


Figura 14– Microbioma vaginal na gravidez e no pós-parto. (Retirado de (MacIntyre, et al., 2015)) – Esta figura demonstra que durante a gravidez o microbioma vaginal é constituído maioritariamente por *Lactobacillus* (CST I, CST II, CST III, CST V), enquanto que no pós-parto predominam bactérias anaeróbias (CST IV). CST IV é maior no pós-parto independentemente da etnia.

Na menopausa a micobiota vaginal passa a ser colonizada maioritariamente por enterobactérias. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

O microbioma vaginal será o microbioma intestinal do recém-nascido, sendo responsável pelo seu metabolismo e imunidade. (MacIntyre, et al., 2015)

#### 5.4 Trato Gastrointestinal

Após o nascimento, o microbioma intestinal é constituído por uma grande quantidade e densidade de bactérias que apresentam diferentes funções no hospedeiro tal como absorção de nutrientes, proteção contra patogéneos e modulação do sistema imunitário. (Yurist-Doutsch, Arrieta, Vogt, & Finlay, 2014) Esta diversidade aumenta do estômago até ao intestino grosso. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) O microbiota encontra-se em constante mudança até ao primeiro ano de vida. Nesta altura, o microbiota gastrointestinal torna-se estável e permanece inalterável excepto em caso de doença ou toma de antibióticos. (Yurist-Doutsch, Arrieta, Vogt, & Finlay, 2014) Apesar da ingestão diária de microrganismos são necessários fatores exógenos como a antibioterapia e a presença de bactérias enteropatogénicas, para desequilibrar o microbiota comensal. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) Antibióticos contribuem para a diminuição da resistência à colonização de membros do microbiota comensal, levando ao desenvolvimento de doenças. (Siezen & Kleerebezem, 2011)

A composição bacteriana intestinal é influenciada por fatores internos e externos que caracterizam a sua constituição e função. A composição do trato gastrointestinal apresenta uma grande diversidade entre indivíduos, sendo que esta varia entre indivíduos magros e obesos e, naquelas pessoas que mantêm hábitos alimentares muito variáveis. A composição bacteriana distinta entre indivíduos são em parte definidas geneticamente ou determinadas por características individuais e ambientais, o que resulta de uma grande variabilidade intra e inter-pessoal. O conhecimento do microbioma poderá influenciar na predisposição e ajudar na promoção da saúde. (Yurist-Doutsch, Arrieta, Vogt, & Finlay, 2014)

O microbiota intestinal é importante na saúde humana mas a amamentação e o tipo de parto afectam a sua composição. Os recém-nascidos nascidos de cesariana como vimos anteriormente, apresentam menores semelhanças com a progenitora, como podemos ver na figura 15. Por outro lado, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* dominam ainda no microbiota intestinal aos 12 meses na criança. (Backhed, et al., 2015)

Como já vimos, a passagem pelo canal vaginal no momento do parto influencia a colonização do trato gastrointestinal do recém-nascido. Em comparação ao microbioma intestinal adulto, os lactentes apresentam maior diversidade microbiana, abrigando menos espécies com menor estabilidade. Há estabilização do microbioma

após a primeira infância, mas ocorrerão modificações em certas situações ao longo da vida. (Moraes, Silva, Almeida-Pititto, & Ferreira, 2014)

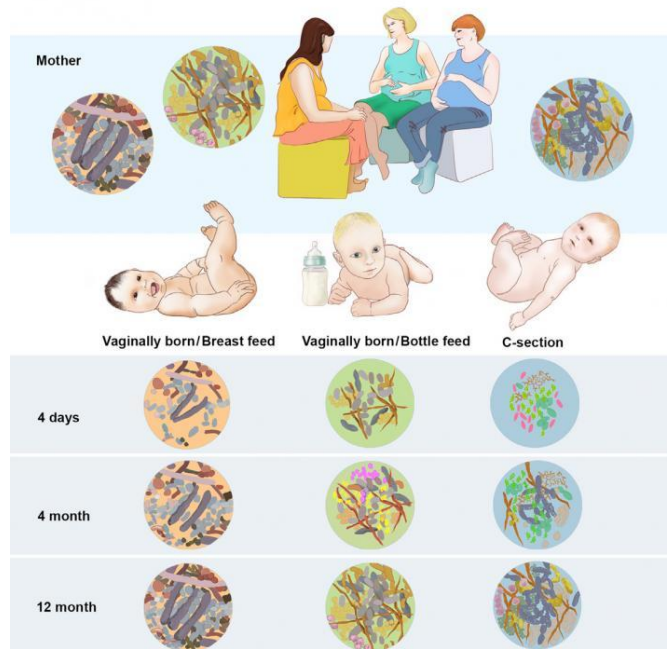


Figura 15– Microbioma Intestinal no recém-nascido dependendo do tipo de parto e amamentação (Retirado de (Backhed, et al., 2015)) - Nesta figura observa-se que recém-nascidos de cesariana tinham menor semelhança com a progenitora do que os que nasceram de parto normal. Além disso, verificou-se que a nutrição é um dos principais fatores de desenvolvimento do microbioma intestinal infantil.

No parto normal, predomina o filo Actinobacteria, especialmente *Bifidobacterium*. Por outro lado, na cesariana, como vimos anteriormente, predomina microrganismos semelhantes aos da pele (*Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides*). (Siezen & Kleerebezem, 2011)

Na maioria dos indivíduos, cerca de 90% dos filos são Firmicutes e Bacteroidetes, sendo o restante composto por Actinobacterias (família Bifidobacteriaceae) e Proteobacterias (família Enterobacteriaceae), ou seja, a maioria das bactérias pertencem a quatro filos. (Doutsch, Arrieta, Vogt, & Finlay, 2014) Em seguida, na ordem de frequência, aparecem os filos Synergistetes, Verrucomicrobia, Fusobacteria e Euryarchaeota, representando uma pequena percentagem do microbioma. As classes integrantes do filo Firmicutes são *Bacilli*, *Clostridia* e *Molicutes* e do

Bacteroidetes são as *Bacteroides*, *Flavobacteria* e *Sphingobacterias*. (Moraes, Silva, Almeida-Pititto, & Ferreira, 2014)

A proporção de bactérias pode variar nos indivíduos adultos devido a alterações ambientais ou estados patológicos. Com o envelhecimento, observa-se a redução de *Bacteroides*, *Bifidobacteria* e menor produção de ácidos gordos de cadeia curta, assim como o crescimento de anaeróbios facultativos, tais como *Fusobacteria*, *Clostridia*, *Eubacteria*, e maior atividade proteolítica. (Siezen & Kleerebezem, 2011) Essas variações parecem estar relacionadas com a perda de paladar, olfato e menor ingestão alimentar. (Moraes, Silva, Almeida-Pititto, & Ferreira, 2014)

O pH ácido do estômago e o pepsinogénio secretado na mucosa deste órgão, impedem a colonização, pois grande parte dos microrganismos ingeridos são destruídos. As espécies resistentes ao ácido clorídrico (HCl) pertencem aos seguintes géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Helicobacter Pylori*, podendo estar este último associado a úlcera péptica e a gastrite. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

O HCl, o peristaltismo intestinal e a elevada concentração de sais biliares fazem com que haja um baixo número de microrganismos no intestino delgado. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014) *Streptococcus*, *Clostridium* e *Veillonella* são dominantes no Intestino Delgado. (Siezen & Kleerebezem, 2011) No início deste temos o microbiota do estômago enquanto na parte final temos o do intestino grosso. O microbiota do cólon é muito variado e abundante. A maioria são anaeróbias (>90%), podendo haver protozoários não patogénicos e leveduras. Existem ainda enterobactérias, sendo as mais comuns *E. Coli* que, em associação com *Enterococcus*, são observados em todos os humanos. (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014)

O ser humano possui cerca de 100 trilhões de microrganismos no intestino. (Flint, 2012)

## 6. Distúrbios no Microbioma

A disfunção do microbioma humano está associada com a obesidade, diabetes, doenças inflamatórias do intestino e doenças auto-imunes. Muitos fatores, exógenos ou endógenos afectam a composição da microbiota, tal como o seu genótipo, a idade, sexo e dieta. (Xu & Knight, 2014)

### 6.1 Dieta

Como mencionado anteriormente, a dieta pode conduzir a alterações no microbioma intestinal. No entanto, este microbioma é muito resistente pelo que uma intervenção alimentar de curto prazo não produz modificações significantes, não sendo eficaz no tratamento da obesidade e desnutrição, por exemplo. (Xu & Knight, 2014)

No entanto, há que ter em conta que pessoas saudáveis podem apresentar uma diversidade no microbiota diferente. Além da alimentação, o tipo de parto durante o nascimento também influencia o microbiota intestinal infantil. O leite materno contém nutrientes, anticorpos e diversas bactérias comensais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterias*. Como visto anteriormente, a diversidade intestinal do bebé é baixa e aumenta com o desenvolvimento deste. (Xu & Knight, 2014)

Existem hidratos de carbono que não são digeríveis. Estes são uma grande fonte de energia para os microrganismos do intestino grosso. A quantidade ingerida destes hidratos de carbono influencia a composição de espécies do microbiota intestinal. A ingestão de alimentos pode conduzir a alterações na densidade da população microbiana sem alterar as espécies do microbiota intestinal. Um aumento na ingestão de fibra alimentar aumenta o trânsito intestinal, o total de número de bactérias, e as concentrações de produtos de fermentação. (Flint, 2012)

A questão de se projetar intervenções alimentares terapêuticas para restaurar a microbiota intestinal saudável e curar doenças provenientes de disbiose permanece sem resposta, exigindo mais estudos acerca disto. No entanto, a dieta é um dos modos mais fáceis de manipular o microbiota intestinal. (Xu & Knight, 2014)

## 6.2 Antibióticos

O microbioma é relativamente estável ao longo do tempo, mas forças externas podem alterar a comunidade de microrganismos do trato gastrointestinal (ex: antibióticos). Os antibióticos são usados para combater espécies bacterianas patogênicas. Três a quatro dias após tratamento com antibióticos de largo espectro verifica-se uma diminuição da diversidade, diminuindo também desta forma a capacidade de resposta do nosso sistema imunitário aos corpos estranhos. O restabelecimento de algumas espécies bacterianas pode ser afetado até 4 anos após o tratamento com este. Sendo assim, devem sempre que possível e necessário, serem prescritos antibióticos de curto espectro de ação para minimizar estas alterações. (Ursell, Metcalf, Parfrey, & Knight, 2012)

## 6.3 Doenças

### 6.3.1 Obesidade

Ratos e humanos obesos demonstram maior proporção do filo Firmicutes e menor proporção do filo Bacteroidetes. Pensa-se que uma explicação para tal seja o facto do filo Firmicutes produzir um metabolismo de energia mais completo, promovendo desta forma a absorção mais eficaz de calorias e conseqüentemente ganho de peso. (Bermon, et al., 2015)

Por outro lado, outra justificação para o microbioma intestinal afetar a obesidade inclui a indução de inflamação de baixo grau com lipopolissacarideo. Além disso, o desequilíbrio do microbiota influencia a maneira como a energia é extraída dos alimentos e armazenada. Isto leva a distúrbios metabólicos. (Bermon, et al., 2015)

### 6.3.2 Alergias

Define-se alergia como uma reação imunológica mediada pela IgE contra um alérgeno (antígenos normalmente inofensivos). Estes anticorpos produzidos (IgE's) ligam-se aos mastócitos (células presentes na pele e nas mucosas tal como nos olhos, nariz e traqueia), havendo libertação de substâncias inflamatórias como a histamina. (Janssen-Cilag Farmacêutica, Lda., 2015)

Nas últimas décadas, houve um aumento acentuado de alergias (asma, rinite alérgica, dermatite atópica, e alergias alimentares), principalmente nos países desenvolvidos. Pensa-se que este aumento seja devido a mudanças de estilo de vida que afetam os microrganismos comensais do organismo humano. (Lovinsky-Desir & Miller, 2012)

Um microbioma saudável representa um papel importante na maturação do sistema imunitário. No entanto, melhorias das condições sanitárias, o aumento do uso de antibióticos e a menor taxa de aleitamento são fatores que têm contribuído nas alterações da flora intestinal. (Lovinsky-Desir & Miller, 2012)

Em países ocidentais a higiene excessiva pode ser a explicação do desenvolvimento de doenças alérgicas. De forma a inibir o desenvolvimento de alergias, durante a infância as crianças devem ser expostas a agentes microbianos. Crianças que desenvolvem alergias apresentam o microbioma comensal intestinal alterado. (Lovinsky-Desir & Miller, 2012)

A exposição da criança a antibióticos durante a amamentação ou medicação oral são fatores que induzem sensibilização na infância. Por outro lado, a presença de *Clostridium difficile* nas fezes de crianças de um mês de idade foi identificada como estando associado a um risco maior de sensibilização alérgica aos dois anos de idade. (Lovinsky-Desir & Miller, 2012)

Estes resultados indicam que o microbioma do intestino saudável desempenha um papel protetor no desenvolvimento de alergias. É necessária uma microflora complexa para evitar alergias. (Lovinsky-Desir & Miller, 2012)

Nos lactentes não atópicos, a capacidade de produzirem citocinas IFN- $\gamma$  através dos linfócitos Th1 aumenta após o nascimento, como resposta aos alérgenos. A presença de Th1 inibe Th2 devido à produção de IFN- $\gamma$ , pelo que esta se encontra reprimida durante o primeiro ano de vida. Nas crianças atópicas, as respostas Th2 específicas para o alérgeno continuam desde a gravidez, com diminuição da capacidade de produzir IFN- $\gamma$  durante a infância. (Lovinsky-Desir & Miller, 2012)

Há relatos que a vacina BCG funciona como um forte ativador de imunidade de Th1 e precocemente inibe o desenvolvimento de asma. (Lovinsky-Desir & Miller, 2012)



O modelo Th1/Th2 não explica o aumento da prevalência de doenças auto-imunes. Na maioria são doenças infecciosas, verificando-se o decréscimo da taxa mediada por Th1. (Lovinsky-Desir & Miller, 2012)

Na figura 16, pode-se observar algumas das patologias que podem resultar de desequilíbrios nas diferentes microbiotas.

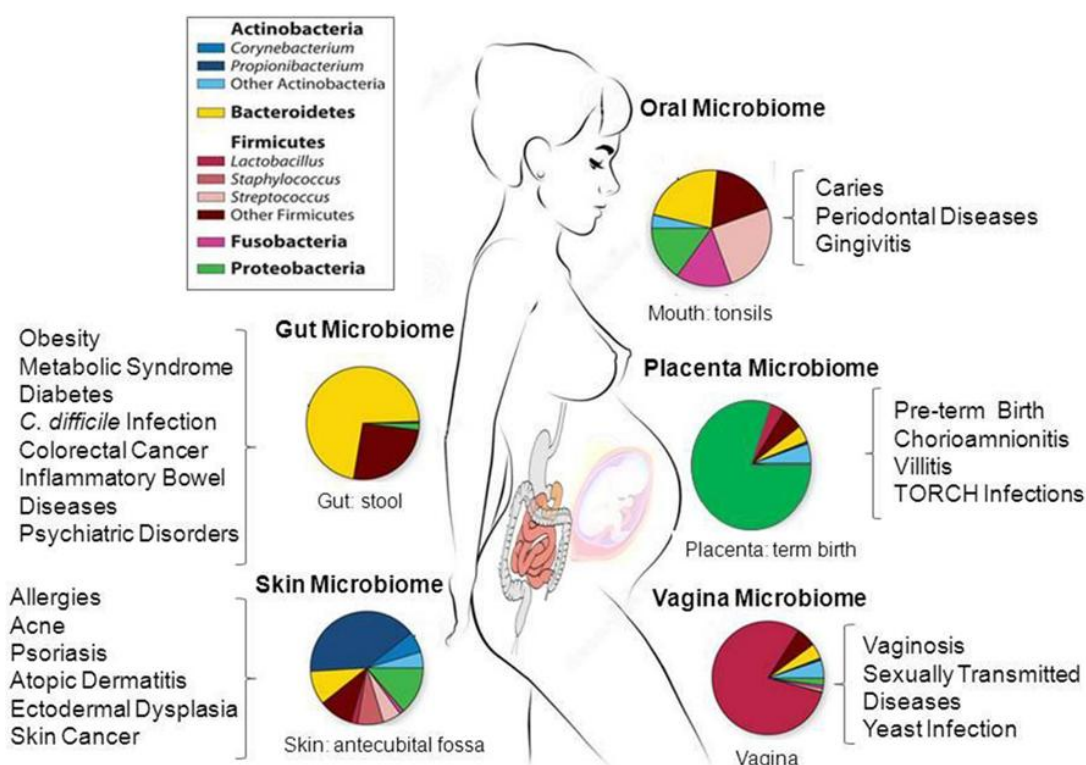


Figura 16- Patologias resultantes de disbioses do microbioma humano. (Retirado de (Belizário & Napolitano, 2015))

## 6.4 Perspetivas futuras

### 6.4.1 Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde. A maioria dos probióticos usados são compostos por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os probióticos têm como função melhorar a barreira imunológica do intestino e diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, associadas a alergia sistémica ou local. (Inoue e Shimojo, 2014)

Probióticos podem ser usados para alterar a comunidade microbiana, havendo assim a possibilidade da sua utilização no tratamento de doenças associadas a disbiose microbiana. (Bikel, et al., 2015)

A administração de probióticos no pré-natal e pós-natal para eficácia na prevenção de eczema, demonstrou que esse efeito só foi significativo para os *Lactobacillus*. (Inoue e Shimojo, 2014)

Os probióticos aumentaram a função imunológica inata, aumentando a capacidade das células fagocíticas e monócitos. Por outro lado na imunidade adquirida, houve um aumento das imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA). (Bermon, et al., 2015)

A utilização de tratamento probiótico não previne o desenvolvimento de pieira na primeira infância e / ou o aparecimento de asma. Além disso, há poucos estudos sobre os efeitos preventivos de probióticos em rinite alérgica ou alergias alimentares. No entanto, vários estudos com ratinhos revelam que *Lactobacillus* mortos pelo calor melhora o equilíbrio Th1/ Th2 e inibe a produção de IgE, verificando ainda assim modificações na resposta imunológica. Conclui-se assim que são necessários mais estudos para avaliar a relação do uso destes com a prevenção de alergias. (Inoue e Shimojo, 2014)

Prebióticos são uma fermentação selectiva que permite mudanças específicas, tanto na composição e/ou actividade do microbioma gastrointestinal, que confere benefícios de saúde e bem-estar. (Inoue e Shimojo, 2014) Por outras palavras, Prebióticos são carboidratos não digeríveis que são escolhidos devido aos benefícios que demonstram para a saúde. (Flint, 2012)

O leite humano contém prebióticos e a presença dessas substâncias no intestino aumenta a proliferação de certas bactérias, especialmente *Bifidobactérias*. Estudos revelam que prebióticos apresentam efeito preventivo no eczema. (Inoue e Shimojo, 2014)

Simbióticos consistem numa combinação de probióticos e prebióticos. Estes alteram significativamente o microbioma intestinal, apesar de não apresentarem efeitos preventivos contra o desenvolvimento de eczema infantil. (Inoue e Shimojo, 2014)

Uma das maneiras de alterar favoravelmente a microbiota intestinal é através do uso de prebióticos, probióticos e simbióticos. Estes agentes podem influenciar favoravelmente interações microbianas com o sistema imune e no epitélio intestinal. (Inoue e Shimojo, 2014)

Probióticos e prebióticos estão a tornar-se cada vez mais populares. Estes estão disponíveis comercialmente em várias formas, incluindo alimentos, suplementos alimentares, e terapêutica clínica com a administração oral ou não oral. (Inoue e Shimojo, 2014)

#### 6.4.2 Interação medicamentosa com probióticos

Bifolac (*Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum*) é um exemplo de probiótico usado com o fim de normalizar a microbiota intestinal ou como profilaxia. Uma vez que os probióticos contêm microrganismos vivos, a administração concomitante de antibióticos pode matar um grande número de organismos, reduzindo a eficácia das espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterias*. (Vyas & Ranganathan, 2012)

Probióticos também devem ser usados com precaução em doentes a tomar imunossuppressores (ex: ciclosporina, tacrolimus, azatioprina e agentes quimioterápicos), pois podem causar infecção ou colonização patogénica em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, estes também interagem com a varfarina. (Vyas & Ranganathan, 2012)

Portanto, a administração com segurança de probióticos, prebióticos e simbióticos pode abrir um novo caminho para uma futura terapia. (Vyas & Ranganathan, 2012)

## **7. Microbioma Humano e Imunoterapia**

Os mamíferos têm mais micróbios que células no corpo. Estes micróbios, para além de ajudarem na digestão e na aquisição de nutrientes, têm mostrado viabilidade de auxílio em determinados tratamentos de doenças através da estimulação do sistema imunitário (Imunoterapia). A primeira imunoterapia relacionada com o cancro foi a toxina de Coley. Esta consiste numa vacina bacteriana mista constituída por duas espécies de bactérias mortas: *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens*. (Nelson, Diven, Huff, & Paulos, 2015)

Há evidências de que o microbiota desempenha um papel importante na maturação do sistema imunitário e na proteção contra patogéneos. É importante o contacto das crianças com os microrganismos. O aumento da diversidade do microbiota intestinal melhora o perfil metabólico e as respostas imunológicas. (Bermon, et al., 2015)



## 8. **Microbioma Humano e Human Immunodeficiency Virus (HIV)**

A infecção com HIV através do ato sexual tem maior incidência em países não desenvolvidos. Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que a comunidade bacteriana da vagina desempenha uma ação protetora contra a infecção com HIV e outras DST's. Através de estudos tem-se verificado que alterações no microbioma vaginal, como por exemplo, desenvolvimento de vaginose bacteriana aumenta o risco de infecção com HIV. Existem diferenças na composição normal do microbioma vaginal de acordo com a etnia. Pessoas de raça negra têm demonstrado diferenças nas bactérias causadoras da vaginose, o que levam a uma maior taxa de prevalência de infecção por HIV nesta etnia. Variações na composição do microbiota é um fator responsável pelas diferenças de susceptibilidade à infecção por HIV. (Buve, Jaspers, Crucitti, & Fichorova, 2014)

À cerca de 10 anos atrás, estudos sobre o microbioma vaginal consideravam a espécie *Lactobacillus* como a dominante no microbiota vaginal saudável. O microbioma humano vaginal considera-se saudável se houver ausência de corrimento vaginal e/ou outros sintomas de vaginite e um pH baixo. No entanto, técnicas moleculares e, especialmente pirosequenciação, levaram a compreender esta complexidade em relação ao microbioma vaginal. Parece não haver um único modelo de microbiota vaginal “saudável” mas sim uma diversidade de composições deste. De acordo com estudos realizados, cerca de 20-27% de mulheres saudáveis têm um microbioma vaginal em que *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*) não é a espécie predominante. Esta é uma característica frequentemente encontrada em mulheres afro-americanas e hispânicas, quando em comparação com mulheres caucasianas. (Buve, Jaspers, Crucitti, & Fichorova, 2014)

Através de esfregaços vaginais foi analisada a microflora vaginal durante a menstruação. Verificou-se um aumento da concentração de *Gardnerella* e uma diminuição de *L. crispatus*, concluindo desta forma que as mulheres estão sujeitas a desequilíbrios do microbioma vaginal ao longo da menstruação. Pensa-se ser devido aos baixos níveis de estrogênio e glicogênio durante a menstruação, pelo que prejudica o crescimento de *Lactobacillus*. Por outro lado, o ferro presente na menstruação estimula o crescimento de *G.vaginalis*. As mulheres que se encontram na menopausa, têm uma microflora vaginal caracterizada por menos *Lactobacillus* em comparação com as mulheres em idade fértil. (Buve, Jaspers, Crucitti, & Fichorova, 2014)

Após infecção por HIV, alterações na flora bacteriana são responsáveis pela propagação da infecção para SIDA. O desenvolvimento de estratégias de forma a manipular o microbioma pode trazer grandes benefícios, como retardar o desenvolvimento consequente da imunodeficiência. Microrganismos prejudiciais como *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus* são mais abundantes em indivíduos infectados por HIV. (Buve, Jaspers, Crucitti, & Fichorova, 2014)

### 8.1 Efeito Protetor do microbiota vaginal

No entanto, o microbioma vaginal saudável desempenha um papel importante no sistema de defesa natural contra o HIV e outras DST's. Estes mecanismos de defesa consistem em antagonismos entre os microrganismos constituintes do microbioma, ações microbicidas diretas de substâncias derivadas de bactérias e mudanças na função imunológica. (Buve, Jaspers, Crucitti, & Fichorova, 2014)

Como vimos anteriormente, a presença de *Lactobacillus sp.* no microbiota vaginal dificulta a colonização e a sobrevivência bacteriana de agentes patogénicos do trato urogenital, tais como *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* do grupo B e *Neisseria gonorrhoeae*, através da produção de factores microbicidas sinérgicos tais como  $H_2O_2$ , bacteriocinas, ácido láctico e provavelmente mais mediadores que ainda não foram identificados. Quando existe vaginose bacteriana, a falta de produção de  $H_2O_2$  por *Lactobacillus* aumenta o risco de infecção por HIV.  $H_2O_2$  tem grandes propriedades microbicidas e eficácia na supressão do crescimento de vaginose bacteriana, sendo as bactérias reduzidas no fluido vaginal e no sémen, possivelmente devido aos antioxidantes que ocorrem naturalmente. Por outro lado, o ácido láctico tem grandes capacidades bactericidas contra o HIV e vaginose bacteriana, quando este se encontra no fluido vaginal a pH ácido. (Buve, Jaspers, Crucitti, & Fichorova, 2014)

A vaginose bacteriana aumenta os níveis vaginais da proteína de choque térmico (HSP), aumentando assim, os níveis de óxido nítrico. O óxido nítrico é um factor imunológico de dupla-ação com actividade microbicida de ampla gama de protecção, e também com ação indesejada, com efeitos pro-inflamatórios e imunossupressores prejudiciais. (Buve, Jaspers, Crucitti, & Fichorova, 2014)

Entre os mais preocupantes efeitos da vaginose bacteriana está a supressão da proteção da imunidade inata e, em particular, a protease do leucócito secretório inibidor (SLPI). SLPI tem ação inibitória direta das propriedades do HIV in vitro. Os níveis vaginais de SLPI estão diminuídos em mulheres com infecções sexualmente transmissíveis (IST) e portanto nestes casos a probabilidade de infecção por HIV é maior. Portanto, a vaginose bacteriana é um fator que diminui negativamente e daí concluímos que aumenta a probabilidade de infecção por HIV. (Buve, Jaspers, Crucitti, & Fichorova, 2014)

## 8.2 Microbioma do Sêmen e Infecção por HIV

Neste subcapítulo pretende-se perceber a relação que existe entre o microbioma do sêmen e a imunologia local e Carga Viral na infecção por HIV. (Liu, et al., 2014)

O Sêmen é uma das formas de transmissão de HIV. A carga viral do esperma varia ao longo do tempo, sendo esta maior do que a presente no sangue. Tendo isto em consideração, há que haver precauções de forma a reduzir a transmissão sexual deste vírus. Além disso, quanto maior a carga viral RNA maior o risco de transmissão. Na presença de infecções genitais e inflamação, ou mesmo na ausência de patogenicidade, pode ocorrer esta infecção viral. (Liu, et al., 2014)

Foram realizados estudos através de pirosequenciação do gene 16S rRNA e PCR quantitativo. Foi analisada a relação das bactérias e espermatozóides na infecção por HIV, os níveis de citocinas no sêmen, ou seja, a emissão de sinais entre as células quando há desencadeamento de respostas imunes. (Liu, et al., 2014)

Independentemente do estado de infecção por HIV, foram encontrados *Staphylococcus* no sêmen. No entanto, *Streptococcus* era a bactéria mais comum no esperma, independentemente do estado da infecção por HIV. Em homens não infectados, na ureia plasmática foi encontrado abundantemente *Mollicutes* enquanto *Mycoplasma* dominava em indivíduos infectados. Com ART, a abundância proporcional de *Mycoplasma* diminuiu ao longo do tempo nos homens infectados. (Liu, et al., 2014)

Outras infecções virais, como por exemplo Citomegalovirus, Epstein-barr, Herpes simples do tipo 1 e 2, assim como infecções bacterianas causadas por *Chlamydia*



*trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, aumentam a carga viral em homens não tratados. (Liu, et al., 2014)

Estes agentes patogênicos interagem com as células T CD4<sup>+</sup> infectadas ou indirectamente, através de activação imunológica e recrutamento de células susceptíveis de HIV para a mucosa genital. (Liu, et al., 2014)

Homens que fazem sexo com homens (HSH), em terapia anti-retroviral supressiva (ART), a ativação de células T no esperma tem sido associada com replicações virais transitórias no sémen, na ausência de outras DST's. Há estudos que dizem que o aumento de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no esperma pode aumentar a replicação de HIV e a evolução no trato genital masculino. (Liu, et al., 2014)

Estudos de infertilidade têm mostrado uma grande variedade de bactérias no sémen, incluindo aquelas que causam processos inflamatórios obstrutivos do trato genital masculino tal como *Chlamydia*, *Ureaplasma* e *Mycoplasma*. *Ureaplasma* e *Mycoplasma*, têm sido implicados na infertilidade masculina. (Liu, et al., 2014)

O sémen é constituído por espermatozoides, nutrientes, fatores imunológicos e bactérias. O microbioma do sémen de homens heterossexuais apresentam alta prevalência de microrganismos comensais, tal como *Ralstonia*, *Anaerococcus* e *Corynebacterium*, bem como as bactérias abundantes da vagina tal como *Prevotella* e *Lactobacillus*. Este representa uma causa de ativação imune, pelo que contribui para o elevado grau de variação dos níveis de HIV no esperma. No entanto, há variação no microbioma do sémen e na carga bacteriana de homem para homem. As bactérias mais prevalentes, presentes em sémen não infectado por VIH, eram: *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Staphylococcus*. Outras bactérias estavam presentes 1-3%, como *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fingoldia*, *Micrococcus* e *Actinomyces*. No entanto, *Prevotella* pode ser encontrado em vários locais do corpo (pénis, vagina, cavidade oral e intestino). (Liu, et al., 2014)

ART restitui a biodiversidade do microbioma do sémen, enquanto homens infectados por HIV e não tratados apresentam baixa biodiversidade. Esta restituição melhora a imunidade do hospedeiro e apoia a imunidade do hospedeiro na regulação das bactérias no sémen. (Liu, et al., 2014)

A carga viral do HIV no s emen   uma medida do grau de infecciosidade das secreções genitais em homens infectados. No entanto, pensou-se na hipótese de que mudanças no microbioma do s emen poderiam influenciar a carga viral. (Liu, et al., 2014)



## 9. Conclusão

Apesar do conceito populacional de que os microrganismos são causadores de doenças, nesta dissertação podemos verificar que não funciona assim como dizem e que o microbioma humano pode ser a solução de várias doenças. Para tal, ao contrário do que se pensa, as crianças devem ter um grande contacto com microrganismos desde pequenas de forma a que o seu microbioma seja muito diverso. Quanto maior a diversidade mais protegido o individuo está de infeções, pois mais desenvolvido está o sistema imunitário. No entanto, o microbioma humano comensal varia de pessoa para pessoa de acordo com inúmeros fatores, sendo que não existe apenas um padrão universal de microbioma “saudável”.

Em relação ao HIV podemos concluir que a raça negra tem maior prevalência de infeção e apresenta um microbioma diferente da população caucasiana.

No entanto, o microbioma está em constante investigação e estudo através das novas tecnologias emergentes com o objectivo de definir quais as várias funções dos microrganismos na saúde humana e doenças e de poderem vir a ser usados na prevenção e/ou tratamento destas últimas.



## 10. Bibliografia

- Backhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatecheeva-Datchary, P., . . . Wang, J. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*, 690-703.
- Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., & Taveira, N. (2014). *Microbiologia Médica 1*. Lisboa: Lidel.
- Belizário, J., & Napolitano, M. (2015). Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches.
- Bermon, S., Petriz, B., Kajënienè, A., Prestes, J., Castell, L., & Franco, O. (2015). The microbiota: an exercise immunology perspective. pp. 70-79.
- Bikel, S., Valdez-Lara, A., Cornejo-Granados, F., Rico, K., Canizales-Quinteros, S., Soberón, X., . . . Ochoa-Leyva, A. (2015). Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal* , 390-401.
- Buve, A., Jespers, V., Crucitti, T., & Fichorova, R. N. (23 de Outubro de 2014). The vaginal microbiota and susceptibility to HIV. pp. 2333-2344.
- Cox, M., Cookson, W., & Moffatt, M. (2013). Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics*.
- Dewhirst, F., Chen, T., Izard, J., Paster, B., Tanner, A., Yu, W.-H., . . . Wade, W. (2010). The Human Oral Microbiome. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 5002-5017.
- DiGiulio, D., Callahan, B., McMurdie, P., Costello, E., Lyell, D., Robaczewska, A., . . . Relman, D. (2015). Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. pp. 1-6.
- Dominguez-Bello, M., & Blaser, M. (2011). The Human Microbiota as a Marker for Migrations of Individuals and Populations. pp. 454-474.

- Dominguez-Bello, M., Blaser, M., Ley, R., & Knight, R. (2011). Development of the Human Gastrointestinal Microbiota and Insights. *GASTROENTEROLOGY*, pp. 1713-1719.
- Doutsch, S., Arrieta, M.-C., Vogt, S., & Finlay, B. B. (2014). Gastrointestinal Microbiota–Mediated Control of Enteric Pathogens.
- Ferreira, W., Sousa, J., & Lima, N. (2010). *Microbiologia*. Lisboa: Lidel.
- Flint, H. (2012). The impact of nutrition on the human microbiome. pp. 10-13.
- Grice, E., & Segre, J. (2011). The skin microbiome. pp. 1-22.
- Grice, E., & Segre, J. (2012). The Human Microbiome: Our Second Genome. *NIH*, pp. 1-22.
- Hiyari, S., & Bennett, K. (2011). Dental Diagnostics: Molecular Analysis of Oral Biofilms. *The Journal of Dental Hygiene*, 257-263.
- Hollister, E., Gao, C., & Versalovic, J. (2014). Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health. pp. 1449-1458.
- Janssen-Cilag Farmacêutica, Lda. (13 de Agosto de 2015). *Alergias*. Obtido de <http://www.janssen.pt/allergies>
- Joshi, M., & J.D., D. (2010). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION . *International Journal of Biomedical Research*, 81-97.
- Ling, Z., Liu, X., Luo, Y., Yuan, L., Nelson, K., Wang, Y., . . . Li, L. (2013). Pyrosequencing analysis of the human microbiota of healthy Chinese undergraduates. *BMC Genomics*.
- Liu, C., Osborne, B., Hungate, B., Shahabi, K., Huibner, S., Lester, R., . . . Kaul, R. (2014). The Semen Microbiome and Its Relationship with Local Immunology and Viral Load in HIV Infection.
- Lovinsky-Desir, S., & Miller, R. (2012). Epigenetics, Asthma, and Allergic Diseases: A Review of the Latest Advancements. *Curr Allergy Asthma Rep*, pp. 211-220.

- Ma, B., Forney, L., & Ravel, J. (2012). The vaginal microbiome: rethinking health and diseases. pp. 1-21.
- MacIntyre, D., Chandiramani, M., Lee, Y., Kindinger, L., Smith, A., Angelopoulos, N., . . . Bennett, P. (2015). The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Scientific Reports*, pp. 1-9.
- Maier, E., Anderson, R., & Roy, N. (2015). Understanding How Commensal Obligate Anaerobic Bacteria Regulate Immune Functions in the Large Intestine. *Nutrients*, 45-73.
- Mizrahi-Man, O., Davenport, E., & Gilad, Y. (2013). Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLOS*, pp. 1-14.
- Moraes, A. C., Silva, I., Almeida-Pititto, B., & Ferreira, S. (2014). Intestinal microbiota and cardiometabolic risk: mechanisms and dietary modulation.
- Morgan, X., & Huttenhower, C. (2012). Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLOS computational biology*, 1-14.
- Morgan, X., Segata, N., & Huttenhower, C. (2012). Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. pp. 51-58.
- National Institutes of Health. (2012). NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body.
- Nelson, M., Diven, M., Huff, L., & Paulos, C. (2015). Harnessing the Microbiome to Enhance Cancer Immunotherapy. pp. 1-12.
- NIH. (s.d.). *Human Microbiome Project*. Obtido de <http://hmpdacc.org/overview/about.php>
- Oda, Y., Hayashi, F., & Okada, M. (2015). Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in patients with intellectual disabilities. *BMC Oral Health*, pp. 1-5.
- Parfrey, L., & Knight, R. (2012). Spatial and temporal variability of the human microbiota. *Clinical Microbiology and Infection*, 5-7.



- Piterina, A., & Pembroke, J. T. (2013). Use of PCR-DGGE Based Molecular Methods to Analyse Microbial Community Diversity and Stability during the Thermophilic Stages of an ATAD Wastewater Sludge Treatment Process as an Aid to Performance Monitoring. *ISRN Biotechnology*, 1-14.
- Schloss, P., & Westcott, S. (2011). Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *American Society for Microbiology*, pp. 3219-3226.
- Schloss, P., Westcott, S., Ryabin, T., Hall, J., Hartmann, M., Hollister, E., . . . Weber, C. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *American Society for Microbiology*, pp. 7537- 7541.
- Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O., & Huttenhower, C. (2013). Metagenomic microbial community profiling using unique cladespecific marker genes. *NIH*, pp. 1-12.
- Siezen, R., & Kleerebezem, M. (2011). The human gut microbiome: are we our enterotypes? *Microbial Biotechnology*, pp. 550-553.
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012). A framework for human microbiome research. *Nature*, pp. 215-221.
- The Human Microbiome Project Consortium. (2013). Structure, Function and Diversity of the Healthy Human. *Nature*, pp. 207-217.
- Turnbaugh, P., Ley, R., Hamady, M., Fraser-Liggett, C., Knight, R., & Gordon, J. (2007). The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*, pp. 1-17.
- Ursell, L., Metcalf, J., Laura, P., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. pp. 38-44.
- Ursell, L., Metcalf, J., Parfrey, L., & Knight, R. (2012). Defining the Human Microbiome. pp. 1-12.
- Vyas, U., & Ranganathan, N. (2012). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond. *Gastroenterology Research and Practice*, 1-16.

*10. Bibliografia*

Xu, Z., & Knight, R. (2014). Dietary effects on human gut microbiome diversity.

Yurist-Doutsch, S., Arrieta, M.-C., Vogt, S., & Finlay, B. B. (2014). Gastrointestinal Microbiota–Mediated Control of Enteric Pathogens.