

João Pedro Nunes Queiroz

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O Microbiota e o Ser Humano” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Elisa Maria Rasteiro da Silva e do Professor Doutor João António Nave Laranjinha e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**João Pedro Nunes Queiroz**

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O Microbiota e o Ser Humano” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Elisa Maria Rasteiro da Silva e do Professor Doutor João António Nave Laranjinha e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, João Pedro Nunes Queiroz, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012144836, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “O microbiota e o ser humano” apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro, que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 12 de setembro 2017.

*João Pedro Nunes Queiroz*

---

(João Pedro Nunes Queiroz)

• U •



C •

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*No day shall erase you from the memory of time.*  
*Virgil*

# Agradecimentos:

*Aos meus pais, por sempre me acompanharem e me terem transmitidos os valores que fazem de mim a pessoa que hoje sou.*

*A minha irmã por toda a paciência e auxílio prestado ao longo deste trabalho.*

*Aos meus colegas que levo comigo para a vida e dos quais nunca me esquecerei.*

*A toda a equipa da Farmácia Guarda Inglesa pela simpatia, perseverança e conhecimento adquirido.*

*Ao Professor Doutor João António Nave Laranjinha pela enorme orientação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.*

## Índice

### Parte I: Relatório de Estágio Farmácia Comunitária

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2. PONTOS FORTES</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1. LOCALIZAÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2. INSTALAÇÕES</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3. RECURSOS HUAMANO – QUADRO TÉCNICO</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4. Software Sifarma2000®</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5. DIFERENTES CONHECIMENTOS ADQUIRIDOS</b> .....	<b>9</b>
2.5.1. Receção de encomendas.....	9
2.5.2. Atendimento ao balcão .....	10
<b>2.6. INTERAÇÃO FARMACÊUTICO/UTENTE</b> .....	<b>10</b>
<b>3. PONTOS FRACOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1. UTENTES FIDELIZADOS</b> .....	<b>11</b>
<b>4. OPORTUNIDADES</b> .....	<b>12</b>
<b>4.1. V PHARM CAREER</b> .....	<b>12</b>
<b>4.2. AÇÕES DE FORMAÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>5. AMEAÇAS</b> .....	<b>12</b>
<b>5.1. PREÇO E STOCKS DE MEDICAMENTOS</b> .....	<b>12</b>
<b>5.2. VENDA DE MEDICAMENTOS FORA DAS FARMÁCIAS</b> .....	<b>13</b>
<b>5.3. CONHECIMENTO SOBRE MEDICAMENTOS GENÉRICOS</b> .....	<b>13</b>
<b>6. CASOS PRÁTICOS</b> .....	<b>14</b>
<b>6.1. VARICELA</b> .....	<b>14</b>
<b>6.2. DOR DE GARGANTA</b> .....	<b>14</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>15</b>

### Parte 2: Monografia “O Microbiota e o Ser Humano”

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>17</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>18</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>19</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>

<b>MICROBIOTA.....</b>	<b>22</b>
<b>TIPOS DE MICROBIOTA.....</b>	<b>22</b>
Pele.....	22
Vaginal.....	27
Gravidez.....	28
Neonatal.....	29
<b>MODULAÇÃO DO MICROBIOTA INTESTINAL .....</b>	<b>32</b>
<b>FATORES EXTERNOS.....</b>	<b>32</b>
Dieta (Pro e Prebióticos).....	32
Antibióticos.....	37
<b>FATORES INTERNOS .....</b>	<b>40</b>
<i>Brain Gut Axis</i> .....	40
Sistema Imunitário.....	43
Sistema Nervoso.....	46
<b>O MICROBIOTA NA SAÚDE E NA DOENÇA .....</b>	<b>49</b>
<b>DOENÇA DE PARKINSON.....</b>	<b>49</b>
<b>MALÁRIA.....</b>	<b>49</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>54</b>

# Parte I: Relatório de Estágio Farmácia Comunitária

# I. Introdução

Este relatório de estágio visa de forma objetiva e pragmática descrever as atividades e conhecimentos adquiridos durante o estágio curricular, estágio esse realizado na Farmácia Guarda Inglesa sob a direção técnica da Dr.<sup>a</sup> Elisa Maria Rasteiro da Silva.

O estágio curricular é de extrema importância pois constitui uma primeira abordagem com a realidade profissional permitindo a aplicação dos conhecimentos consolidados durante os 4 anos e meio de formação do mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas e adquirir novos. O papel do farmacêutico hoje ultrapassa a dispensa do medicamento, atualmente ele constitui um agente de saúde pública sendo responsável pela divulgação da saúde e do bem-estar. Para além do papel do farmacêutico também o papel da farmácia evoluiu com o passar do tempo, passando de um espaço de cedência de medicamentos para um de cedência de serviços, permitindo a determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos, revisão da medicação e rastreios dos mais variados tipos.

Este relatório está elaborado de modo a realizar uma análise SWOT "*Strengths, Weakness, Opportunities, Threats*" para que seja mais fácil descrever a minha vivência durante o estágio.

## 2. Pontos Fortes

### 2.1. Localização

A farmácia Guarda Inglesa encontra-se localizada como o nome indica, na Avenida Guarda Inglesa na freguesia de Santa Clara perto do Portugal dos pequenitos em Coimbra, na sua vizinhança encontram-se a Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física, a Escola Básica Poeta Manuel da Silva Gaio e uma zona residencial, esta localização permite assim uma distribuição equilibrada no que diz respeito a faixa etária dos utentes da farmácia possibilitando assim uma experiência mais completa. Esta ampla diversidade é possível devido ao constante profissionalismo e simpatia da equipa, aos já XX anos de existência da farmácia, anteriormente como Farmácia M. Nazaré, que possibilitou a fidelização de diversos utentes e a mais recente localização.

### 2.2. Instalações

As instalações são constituídas por uma extensa sala de atendimento, com 4 balcões distintos, um gabinete de apoio para a determinação dos parâmetros bioquímicos e

fisiológicos, uma zona destinada à produção de manipulados e um armazém num piso inferior. As dimensões generosas da sala de atendimento permitem uma boa organização e exposição dos diferentes cosméticos, produtos de uso veterinário, dispositivos médicos e medicamentos não sujeitos a receita médica pelos diferentes lineares.

## 2.3. Recursos Humanos - Quadro Técnico

O quadro técnico da farmácia atualmente é composto por 3 farmacêuticas e um técnico de farmácia. A equipa abrange as mais variadas faixas etárias desde os 20 até aos 60 anos permitindo uma aprendizagem mais ampla desde as funções mais clássicas como a receção e conferência de encomendas até as mais modernas, como a divulgação dos diferentes serviços e promoções no *Facebook*.

Cada elemento do quadro tem as suas funções específicas atribuídas, mas colaboram sempre entre si havendo uma grande coesão. Cada um deles sempre me apoiou e me fez sentir integrado apesar de todos os meus insucessos e dificuldades, esclarecendo todas as minhas dúvidas, contribuindo para o meu sucesso e aprendizagem neste estágio.

## 2.4. Software *Sifarma2000*<sup>®</sup>

Este *software* constitui um instrumento essencial para auxiliar o farmacêutico no seu trabalho permitindo a visualização de todo o tipo de informação científica sobre os diferentes medicamentos como interações, composição e posologia e a criação de fichas que facilitam o acompanhamento dos utentes. No que diz respeito a gestão, este *software* é também bastante útil constituindo uma plataforma muito simples para a análise de estatísticas de vendas, para a gestão de *stocks* e realização de encomendas ou devoluções aos armazenistas. Mesmo com todas estas virtudes o *Sifarma2000*<sup>®</sup> acaba por pecar por apresentar um ambiente gráfico desatualizado, não suportar *input* pelo teclado em varias áreas e apresentar erros nas fichas de alguns produtos.

## 2.5. Diferentes Conhecimentos Adquiridos

Durante o meu estágio passei por diferentes posições e fases, tendo começado por dar entrada de encomendas para me familiarizar com a forma como os diferentes medicamentos estão organizados e realizado a determinação de parâmetros bioquímicos, nomeadamente glucose, colesterol, bem como a medição da pressão arterial, culminando no fim com o atendimento ao público.

### 2.5.1. Receção de encomendas

Esta fase inicial é essencial para perceber o modo de funcionamento da farmácia, permitindo uma familiarização com as instalações e com os diferentes medicamentos comercializados o que iria levar mais tarde, a uma maior agilidade durante o atendimento ao público.

A determinação dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos é realizado num gabinete de apoio e está destinada não só a fornecer um serviço ao utente, mas a criar uma relação, uma empatia que faça o doente voltar a farmácia, as determinações incluem a glicémia, a pressão arterial, o colesterol total e os triglicerídeos. Esta foi a altura em que eu tive pela primeira vez contacto com os utentes da farmácia e procurei saber os seus hábitos e modos de vida, aconselhando-os sempre da melhor maneira possível privilegiando as medidas não farmacológicas. Esta fase também constituiu um primeiro contacto com o *software* utilizado, o *Sifarma2000*<sup>®</sup>.

### 2.5.2. Atendimento ao balcão

Esta fase constituiu a aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do estágio e dos últimos 4 anos e meio de formação no mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas e permitiu-me realizar atendimento ao público, o que constitui uma das experiências que mais me realizou e me fez perceber o quão essencial é o papel do farmacêutico no acompanhamento dos utentes para que se atinja o sucesso terapêutico.

Inicialmente limitei-me a observar os atendimentos realizados pelos outros elementos de modo a assimilar perguntas, explicações frequentes e que aspetos deveria focar mais durante o contacto com o utente, mais tarde quando passei a atender, reparei que grande parte dos atendimentos constituem utentes com prescrição médica que apesar de constituir uma comunicação diferente com o utente não é limitada à cedência do medicamento, é essencial que o utente saia completamente esclarecido em relação a terapêutica que vai realizar, para tal deve-se reforçar toda a informação necessária como o propósito do tratamento, a posologia e duração do mesmo, recorrendo a métodos de comunicação verbal e não-verbal como escrever a posologia na embalagem dos medicamentos, nos restantes casos, aqueles que procuram o aconselhamento que se faz por excelência na farmácia, constituíram os mais desafiantes e estimulantes momentos do meu estágio. É essencial para o Farmacêutico como agente de saúde pública estimular o uso racional do medicamento, compreendendo e analisando cada situação com que se depara para isso deve-se recolher os dados necessários do utente como preferências, sintomas,

queixas, se faz alguma medicação ou possui alguma doença, idade e sexo, acabando por recomendar ao utente medidas não farmacológicas e/ou aconselhando o ou os medicamentos não sujeitos a receita médica mais indicados e que respeitem uma relação eficácia/custo esclarecendo sempre quaisquer dúvidas que o utente possa ter.

## 2.6. Interação Farmacêutico/Utente

Mais uma vez neste ponto quero evidenciar a importância da relação estabelecida entre o farmacêutico e os diversos utentes como instrumento essencial para o sucesso da terapêutica instituída, tal sucesso depende da comunicação estabelecida com o utente durante o atendimento, comunicação essa que deve primar sempre por uma atitude positiva e simpática independentemente do tipo de utente que se encontra a nossa frente.

Para muitos utentes já fidelizados, a dispensa de medicamentos já era quase secundária visto que o que eles realmente procuravam era alguém para conversar e falar um pouco da sua vida, histórias por vezes fascinantes demonstrando mais uma vez o enorme elemento de interação humana que está inerente à profissão.

## 3. Pontos Fracos

### 3.1. Utentes fidelizados

Os utentes fidelizados inicialmente constituíram um entrave à minha aprendizagem pois com muita frequência, preferiam ser atendidos por qualquer outro elemento, ficando à espera que um dos outros balcões ficasse livre para que fossem atendidos por outra pessoa que não eu. Este facto é facilmente justificado pois eu constituía uma cara estranha com a qual eles não tinham confiança e não estava a par das suas preferências no caso de medicação crónica. Felizmente à medida que o estágio foi progredindo e se estabeleceu uma relação de confiança, este aspeto foi tornando-se cada vez menos frequente.

## 4. Oportunidades

### 4.1. V edição do PharmCareer

A V edição do PharmCareer foi mais uma vez realizada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e permitiu uma abordagem de diversos temas como a criação de CV, desenvolvimento de "soft skills" e "networking" essenciais para o mundo do trabalho. Esta abordagem foi feita por meio de várias palestras e uma visita a um armazenista e constitui uma ferramenta interessante para o esclarecimento das várias áreas em que o farmacêutico pode atuar.

### 4.2. Ações de formação

Durante o estágio foi-me permitido frequentar diversas formações sobre os mais diversos produtos permitindo-me colmatar falhas nos meus conhecimentos, especialmente na área da cosmética. Grande parte das formações eram compostas por uma exposição e explicação das diversas linhas que cada marca possuía, incluindo apresentação de novos produtos, permitindo assim realizar um melhor aconselhamento e tomar conhecimento dos diversos tipos de hidratantes, BB creams, águas micelares, águas termais e solares existentes e as suas aplicações.

## 5. Ameaças

### 5.1. Preços e stocks de medicamentos

Durante o meu estágio ocorreram vários momentos que apesar de estarem completamente fora do meu alcance punham em causa a minha honestidade, grande parte dessas situações estavam relacionadas com o preço dos medicamentos, muitas vezes as pessoas não percebiam que o aumento de preço de certos medicamentos sujeitos a prescrição médica estava completamente fora do controlo da farmácia ou, que a farmácia era obrigada a aumentar o preço de certos produtos de venda livre devido ao armazenista os ter aumentado em primeiro lugar. Outra situação relativamente comum, está relacionada com os preços que se encontram nas guias de tratamento, depois da DCI, onde normalmente se encontra escrito "esta prescrição custa-lhe no máximo..." as pessoas não têm noção que aquele preço corresponde ao medicamento mais barato dentro daquela

substância/dosagem/quantidade o que muitas vezes corresponde a um medicamento genérico específico e não ao de marca ou a outro genérico mais caro.

Outro problema está relacionado com a escassez de certos medicamentos e com a ausência de explicações para essa escassez por parte dos laboratórios, tornando difícil para a farmácia explicar esta situação e os utentes a compreenderem, um caso concreto disto aconteceu com o Pradaxa<sup>®</sup> 20mg (dabigatranato etexilato) um dos anticoagulantes de nova geração (não antagonistas da vitamina K).

## 5.2. Venda de medicamentos fora das farmácias

Desde 2005 que se tornou possível vender medicamentos não sujeitos a receita médica fora das farmácias, esta legislação para além dos estragos a nível económico que causou nas farmácias é de uma extrema irresponsabilidade social pois facilita uma automedicação em que muitas vezes nem os próprios utentes nem quem dispensa os medicamentos têm conhecimento dos efeitos nefastos que podem causar. Um exemplo muito simples é o caso do ibuprofeno que não deve ser tomado por quem possua algum tipo de compromisso a nível renal ou por quem esteja a tomar medicação com margem terapêutica baixa devido ao seu efeito vasoconstritor sistémico.

## 5.3. Conhecimentos sobre medicamentos genéricos

Sente-se na população em geral um grande equívoco em relação a igualdade de propriedades entre medicamentos de marca e medicamentos genéricos, não dando a estes últimos um efeito terapêutico equivalente aos primeiros. Os utentes têm dificuldade em perceber como é que os genéricos conseguem ser por vezes tão mais baratos que os medicamentos de marca e mesmo assim terem o mesmo efeito, ficando muitas vezes desconfiados e chegando a desconfiar da honestidade dos laboratórios ou até mesmo do próprio farmacêutico.

Sinto que ainda será necessário continuar por muito e longo tempo a insistir em campanhas de informação/esclarecimento junto da população em geral sobre a bioequivalência entre medicamentos genéricos e de marca, de modo a aumentar a literacia em saúde e mais concretamente em medicamentos, de certas camadas da nossa população. A própria farmácia pode ter aqui um papel importante no aconselhamento e esclarecimento destas situações, ajudando a estabelecer laços de confiança e contribuindo em última estância para a fidelização de clientes.

## 6. Casos Práticos

Para ilustrar os diversos casos com que contactei durante o período em que realizei atendimento ao público, apresento os seguintes casos.

### 6.1. Varicela

Uma mãe preocupada dirigiu-se a farmácia, procurava saber o que dar a filha visto que esta tinha começado a desenvolver pelo corpo todo bolhas vermelhas e desconfiava que se tratava de varicela.

Foi explicado a utente que caso se confirmasse a sua suspeita, a varicela, tal como a gripe, trata-se de uma doença auto-limitada pelo que o tratamento consiste apenas no alívio dos sintomas e não no tratamento da doença em si, pois em indivíduos imunocompetentes as lesões desaparecem por si ao fim de uma semana. Recomendou-se HeltiQ Varicela<sup>®</sup> que consiste num gel refrescante com propriedades antissépticas que alivia a comichão derivada das vesículas de modo a minimizar o aparecimento de cicatrizes e impede a infeção das vesículas caso sejam coçadas, devendo ser aplicado numa fina camada e com as mãos lavadas. Este dispositivo médico inclui também saquetas com extrato de farelo para episódios de prurido intenso, cujo conteúdo deve ser dissolvido numa banheira com água morna. A criança não deve ser enxaguada com água depois do banho nem deve usar gel de banho em conjunto com o conteúdo das saquetas.

### 6.2. Dor de garganta

Diversos casos ocorreram em que os utentes procuravam auxílio para minimizar a dor de garganta, num desses casos uma senhora dirigiu-se a farmácia com esse mesmo objetivo, foi-lhe perguntado se sentia apenas uma pequena irritação ou se já sentia bastante dor, ao que ela respondeu que ainda não lhe doía muito, perguntei-lhe desseguida se era diabética, ela respondeu que não. Visto que se tratava apenas duma ligeira irritação da garganta sugeri Strepsils<sup>®</sup> Mel e Limão e indiquei que deveria tomar uma pastilha quando sentisse dor.

## 7. Conclusão

Em suma, tenho a referir que este estágio curricular foi uma experiência extremamente enriquecedora, que me permitiu consolidar os conhecimentos adquiridos durante os últimos 4 anos e meio, adquirir muitos outros e ter a oportunidade de os por em prática. Permitiu-me também ter um maior conhecimento do papel do farmacêutico na sociedade e da sua importância no sucesso terapêutico e no uso racional do medicamento.

No fim a prevalência das experiências positivas em relação as negativas permitiram-me realizar, que este estágio foi uma ferramenta extremamente fundamental e determinante para o meu futuro como farmacêutico.

## 8. Bibliografia

Despacho 17690/2007 de 23 de julho. Diário da República, 2ª Série, nº154, (2007), 22849-22850.

## Parte 2: Monografia “O Microbiota e o Ser Humano”

# Lista de Abreviaturas

- BMP<sup>2</sup> – Bone Morphogenetic Protein*
- AMP – Adenosine monophosphate*
- ANS – Autonomic Nervous System*
- BDNF – Brain Derived Neurotrophic Factor*
- cAMP – Cyclic adenosine monophosphate*
- CRH – Corticotropin-releasing hormone*
- CSF-1R – Colony-stimulating factor 1 receptor*
- EC – Enterochromaffin cells*
- ENS – Enteric Nervous System*
- FOS – Fructooligosaccharide*
- GABA –  $\gamma$ -Aminobutyric Acid*
- GALT – Gut-Associated Lymphoid Tissue*
- GI – Gastro Intestinal*
- GLP-1 – Glucagon-like Peptide-1*
- GOS – Galactooligosaccharide*
- H2RB – Histamine-2 Receptor blockers*
- HMO – Human milk oligosaccharides*
- HPA – Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis*
- IFN- $\gamma$  – Interferon gamma*
- IgE – Immunoglobulina E*
- iNKT – Invariant Natural Killer T*
- LPS – Lipopolysaccharide*
- NICU – Neocare Intensive Care Unit*
- RNA – Ribonucleic acid*
- SCFA – Short Chain Fatty Acids*
- SERT – Serotonin-Selective Reuptake Transporter*
- SNC – Sistema Nervoso Geral*
- Tph1 – Tryptophan Hydroxylase 1*
- VFA – Volatile Fatty Acids*
- VRE – Vancomycin-resistant enterococci*

# Resumo

O ser humano coexiste com as mais diversas espécies bacterianas. Esta coexistência dá-se devido aos benefícios mútuos existentes para ambos, a espécie humana fornecendo nutrientes necessários à sobrevivência das espécies bacterianas e estas contribuindo para o nosso desenvolvimento, nomeadamente auxiliando no desenvolvimento do SNC e do Sistema imunitário. Estas espécies que colonizam o intestino, a pele e diversas mucosas como a nasal, bucal, vaginal e pulmonar constituem o microbiota que é, portanto, o conjunto das espécies associadas a uma determinada região. O conjunto das interações entre o microbiota e o seu habitat denomina-se microbioma.

Neste trabalho irei abordar vários tipos de microbiota existentes no corpo humano dando especial ênfase ao microbiota intestinal e a modulação deste. O microbiota intestinal é composto por diversos microrganismos incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus. Estima-se que cada indivíduo contenha mais de 100 espécies diferentes no seu trato gastrointestinal e que estas sejam compostas por um total de  $10^{13} - 10^{14}$  células, o que representa um número cerca de dez vezes maior que o representado pelas células eucariotas. Também será abordado os efeitos que fatores externos como probióticos, prebióticos, antibióticos e fatores internos como o *Brain Gut Axis*, sistema imunitário e nervoso têm neste. Por fim irei referir o potencial impacto clínico que o microbiota e o desequilíbrio deste (disbiose) poderão ter na doença de Parkinson, na malária e um novo método clínico de diagnóstico, que procura padronizar o microbiota e a partir disso traçar o perfil dele, permitindo facilmente identificar períodos de disbiose. Isto por sua vez é um passo na criação de uma infraestrutura necessária para no futuro poder utilizar o microbiota como uma estratégia de diagnóstico, para a monitorização de regimes terapêuticos prescritos e para a melhoria de novas aproximações terapêuticas.

**Palavras-Chave:** Microbiota; Microbioma; Microrganismos; Eixo-Cérebro-Intestino; Disbiose; Homeostase; Sistema Nervoso; Sistema Imunitário.

# Abstract

The human being coexists with the most diverse bacterial species. This coexistence is due to the mutual benefits existing for both. The human species provides nutrients necessary for the survival of bacterial species and these contribute to our development, assisting in the development of the CNS and the immune system. These species that colonize the intestine, the skin and various mucosae such as nasal, mouth, vaginal and pulmonary establish the microbiota, which is the group of species associated to a certain region. The set of interactions between the microbiota and its habitat is called microbiome.

In this work, I will address several types of microbiota in the human body with special emphasis on the intestinal microbiota and its modulation. The intestinal microbiota is composed of several microorganisms including bacteria, fungi, protozoa and viruses. It is estimated that each individual contains more than 100 different species in their gastrointestinal tract and that these are composed by a total of  $10^{13} - 10^{14}$  cells, representing a number ten times greater than the one represented by eukaryotic cells. We will also address the effects that external factors such as probiotics, prebiotics, antibiotics and internal factors such as the Brain Gut Axis, immune and nervous system have in the microbiota. Finally, I will mention the potential clinical impact that the microbiota and its imbalance (dysbiosis) may have on Parkinson's disease, malaria and a new clinical diagnostic method, which seeks to standardize the microbiota and from there to outline its profile, allowing to easily identify periods of dysbiosis. This is a necessary step in creating an essential infrastructure for the future use of the microbiota as a diagnostic strategy, for the monitoring of prescribed therapeutic regimens and for the improvement of new therapeutic approaches.

**Keywords:** Microbiota; Microbiome; Microorganisms; Brain-Gut-Axis; Dysbiosis Homeostasis; Nervous System; Immunary System.

# Introdução

Nenhum organismo consegue prevalecer por si só. Todos eles, incluindo o ser humano, coexistem não só entre si, mas num mundo repleto de microrganismos. Apesar de alguns deles serem extremamente patogénicos, no geral a nossa interação com os mesmos é essencial para o nosso desenvolvimento, especialmente para o do nosso sistema imunitário e nervoso.<sup>1</sup>

A microbiota tem um papel especialmente preponderante a nível gastrointestinal, onde é essencial para diversas funções tais como a manutenção da barreira epitelial, a inibição da colonização por parte de agentes patogénicos da mucosa intestinal, modulação e maturação do sistema imunitário, degradação de compostos de origem glucídica - que de outra maneira não seriam degradados - e produção de diferentes metabolitos como vitaminas (vitaminas K e B), SCFA's (Ácidos Gordos de Cadeia Curta), metabolismo de ácidos biliares, esteróis e xenobióticos. Este é influenciado por fatores externos como a dieta (Pre e Probióticos) e antibióticos e fatores internos como o eixo *Brain Gut Axis*, Sistema Nervoso e o Sistema Imunitário.<sup>2,3</sup>

Esta interação começa desde muito cedo e a um nível genético sendo que os nossos genes regulam o microbiota colonizador, e o microbiota por sua vez regula a expressão dos nossos genes pelo que um individuo possui uma predisposição para uma certa população microbiótica, o que por sua vez vai ter influencia na regulação da expressão genética dessa mesma pessoa.<sup>4</sup>

Toda esta interação é mediada pelo *Brain-Gut Axis* que é constituído por diversos componentes como o sistema nervoso central, o sistema endócrino e imunitário, o eixo hipotálamo-hipófise-glândulas suprarrenais, o sistema nervoso autónomo, entérico e o microbiota intestinal.<sup>4</sup> No que diz respeito a comunicação num sentido descendente, o SNC controla o trato GI e o ENS através do ANS, mais concretamente através dos sistemas nervosos simpático e parassimpáticos e também através do eixo HPA. O microbiota por sua vez consegue comunicar com o ENS, o cérebro e entre si através da secreção de diversos metabolitos como SCFAs, GABA, precursores do triptofano, serotonina, catecolaminas e citoquinas

Com este trabalho pretende-se abordar os diferentes tipos de microbiota presentes nos diferentes órgãos, tecidos e fluidos, mas irá dar-se especial ênfase à relação *Brain-Gut Axis* e ao papel essencial que esta tem na manutenção da homeostase. Outro ponto de especial importância que irá ser abordado é o futuro papel do microbiota como ferramenta

adicional de diagnóstico e de terapêutica em diversas doenças do trato gastrointestinal, doenças do foro psicológico como depressões crónicas, doença de Parkinson e na malária.

# Microbiota

O ser humano coexiste com as mais diversas espécies bacterianas. Esta coexistência dá-se devido aos benefícios mútuos existentes para ambos, a espécie humana fornecendo nutrientes necessários à sobrevivência das espécies bacterianas e estas contribuindo para o nosso desenvolvimento, nomeadamente auxiliando no desenvolvimento do SNC e do Sistema imunitário.<sup>5</sup> Estas espécies que colonizam o intestino, a pele e diversas mucosas como a nasal, bucal, vaginal e pulmonar constituem o microbiota que é, portanto, o conjunto das espécies associadas a uma determinada região. O conjunto das interações entre o microbiota e o seu habitat denomina-se microbioma.<sup>2,3</sup>

A microbiota tem um papel especialmente preponderante a nível gastro-intestinal, onde é essencial para diversas funções tais como a síntese de diversas vitaminas, obtenção de energia a partir de ácidos gordos de cadeia curta, metabolismo de ácidos biliares, esteróis e xenobióticos.<sup>2</sup> Esta interação começa desde muito cedo e a um nível genético sendo que um indivíduo possui uma predisposição para uma certa população microbiótica, o que por sua vez vai ter influência na regulação da expressão genética dessa mesma pessoa.<sup>4</sup>

## Tipos de microbiota

Durante a última década realizaram-se várias descobertas sobre as relações simbióticas e essenciais para a homeostase que existem entre o nosso organismo e o microbiota presente nos diferentes órgãos, tecidos e fluidos. O papel atribuído a estes microrganismos foi evoluindo ao longo do tempo desde meros contaminantes para, na atualidade, acarretarem o potencial de se tornarem elementos chave em conjunto com a epigenética para redefinir a medicina do futuro. Nesta revisão irão ser abordados de modo sucinto os diferentes tipos de microbiota existentes.

### Pele

A pele constitui uma barreira mecânica e biológica mantendo a homeostase do organismo contra diversas ameaças de natureza igualmente diversa, sendo responsável pela termorregulação, melanogénese e funções imunológicas.<sup>6</sup>

Inicialmente considerava-se que o microbiota cutâneo era composto exclusivamente por agentes potencialmente infecciosos, mas devido a pesquisas realizadas pelo *Human microbiome project* entre outros projetos descobriu-se que na realidade o que existe é uma relação de mutualismo que é essencial para a saúde do ser humano.<sup>6</sup>

Hoje em dia devido a maior acessibilidade de técnicas de sequenciação tornou-se mais fácil realizar a identificação das diferentes espécies que constituem este ecossistema, deixando de ser necessário identificar estas espécies através de culturas, o que muitas vezes se torna difícil ou até mesmo impossível uma vez que não é possível cultivar certos microrganismos numa cultura pura em condições *in vitro* pois estes necessitam de fatores doutros organismos para se desenvolverem ou necessitam destes como hospedeiro. Atualmente a identificação é feita normalmente através da sequenciação do gene 16S do RNA ribossomal. A utilização deste gene prende-se com a conclusão de que ao comparar as sequências de diversos organismos chegou-se à conclusão que as mesmas se mantêm bastante constantes entre organismos do mesmo género e espécie, mas diferem entre organismos de diferentes géneros e espécies.<sup>6, 7, 8</sup>

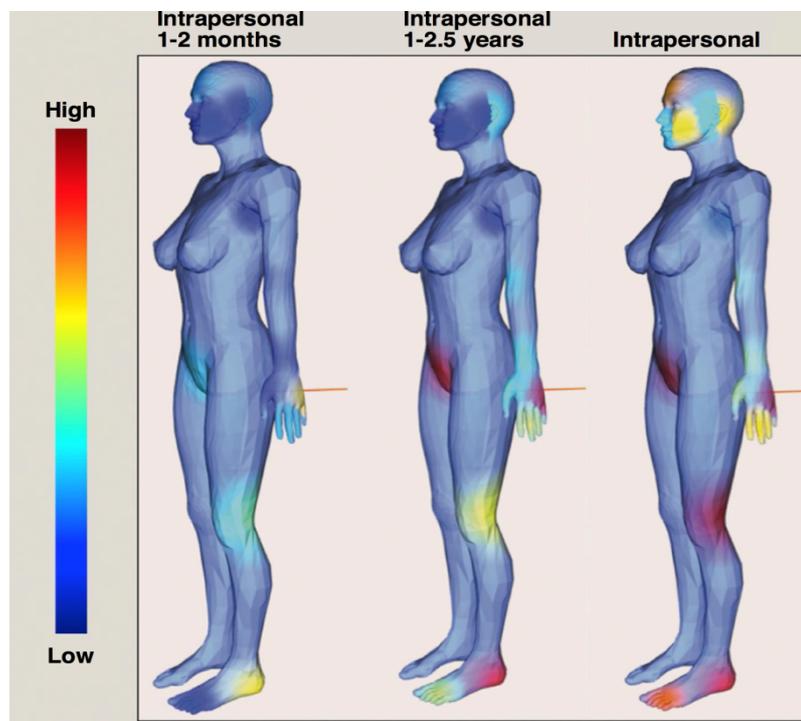
Atualmente sabe-se que o microbioma cutâneo não é constituído unicamente por bactérias, sendo composto também por fungos, parasitas e vírus. Estima-se que existam no total aproximadamente  $10^{10}$  microrganismos na pele de um adulto saudável, no entanto estes seres encontram-se distribuídos de uma maneira pouco uniforme pelo corpo havendo zonas pouco colonizadas como a face posterior dos dedos ( $10^2 \text{ cm}^{-2}$ ) e outras densamente colonizadas como a testa e axilas  $10^6 \text{ cm}^{-2}$  (Figura 1).<sup>6</sup>

Devido às suas diversas funções protetivas, a pele impede a maioria das colonizações por microrganismos patogénicos. A microbiota residente tem por isso de se adaptar a estas condições hostís, tais como a temperatura relativamente baixa da pele ( $29-34^\circ\text{C}$ ), o seu pH ácido (4,5-5,5), a constante proliferação de células epiteliais na derme com conseqüente descamação da camada córnea da epiderme e presença de diferentes tipos de células responsáveis por processos de imunidade inata e adquirida.<sup>6</sup>

Existem mais de 25 filos presentes no microbioma cutâneo, mas a maioria das bactérias presentes neste microbioma (>90%) são pertencentes a um de três filos, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*.<sup>6</sup> Está comprovado que a composição do microbioma varia de indivíduo para indivíduo e é dependente da zona do corpo, idade e sexo.<sup>6</sup> As zonas sebáceas, como por exemplo a testa e o pescoço são habitadas especialmente pelas famílias *propionibacteria* e *staphylococci* enquanto que as zonas húmidas são dominadas por *Corynebacteria* e *staphylococci* (Figura 2).<sup>6</sup> Ao contrário da face posterior das mãos a face palmar é uma das mais densamente populadas contendo mais de 4700 espécies bacterianas diferentes, grande parte delas pertencem aos géneros *Propionibacterium* (31,6%), *Streptococcus* (17,2%), *Staphylococcus* (8,3%), *Corynebacterium* (4,3%) e *Lactobacillus* (3,1%), sendo que no mesmo indivíduo as duas mãos apenas partilham 17% da população e entre indivíduos diferentes 13%.<sup>6</sup>

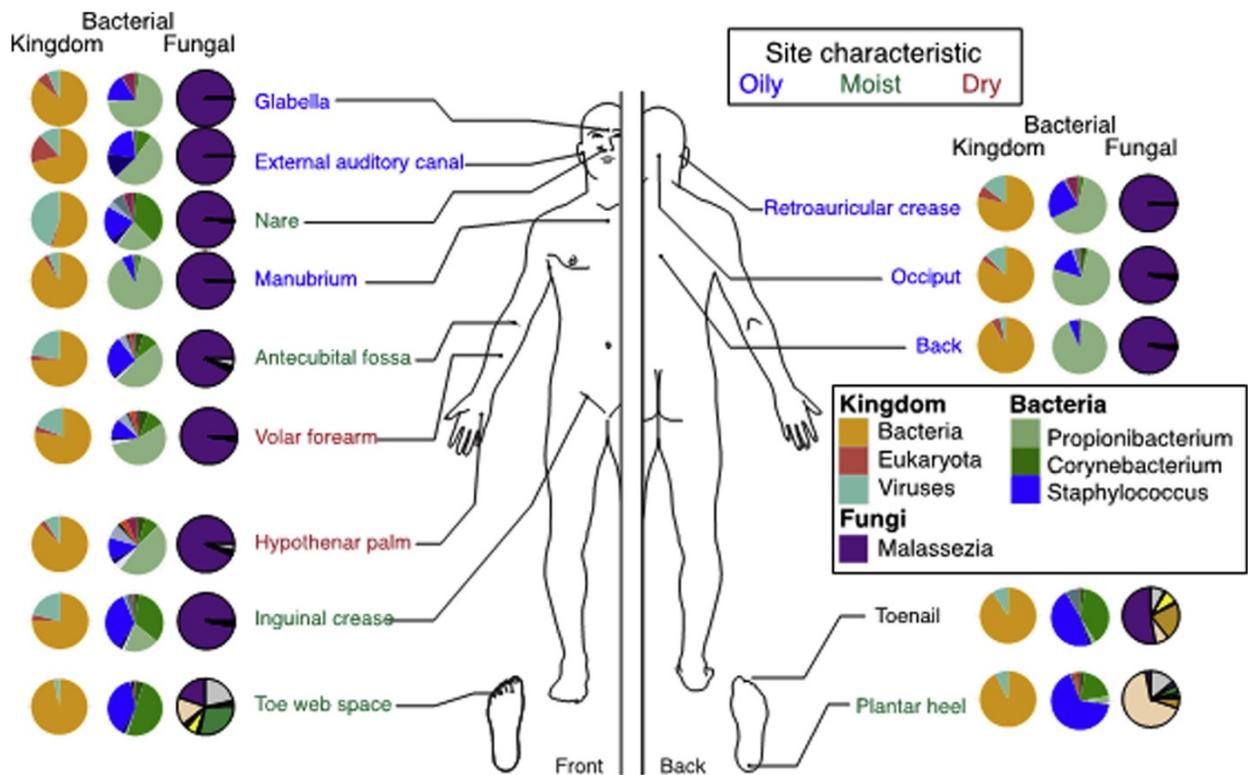
Diversos fatores afetam a composição do microbiota cutâneo, quer sejam eles fatores intrínsecos como a idade, sexo, predisposição genética e estado imunológico ou fatores extrínsecos como o estilo de vida (dieta, roupa), higiene pessoal e fatores ambientais tais como a quantidade de radiação solar, estes fatores terão diferentes impactos consoante a zona da pele exposta, a duração da exposição e a idade da pessoa.<sup>6</sup>

A simples colonização da pele pelo microbiota confere resistência à colonização por espécies patogénicas como *Staphylococcus aureus*. Para além deste efeito passivo, anaeróbios facultativos como *Propionibacterium acnes* degradam as secreções provenientes das glândulas sebáceas em ácidos gordos livres através das suas enzimas lipolíticas, contribuindo para a manutenção do pH ácido da pele.<sup>6</sup> Outro mecanismo que aumenta a resistência à colonização, consiste na produção de bacteriocinas e outros fatores antimicrobianos. Espécies como o *staphylococcus epidermis* produzem proteases que destroem os biofilmes do *Staphylococcus aureus* ou o caso de *S. lugdunensis* que produz lugdunine, um peptídeo cíclico com propriedades antimicrobianas capaz de impedir a colonização de *S. aureus* e de outras espécies multirresistentes como *Enterococcus faecalis* vancomicina resistente e *Pseudomonas aeruginosa*. Infelizmente esta substância é altamente imunogénica e como tal apenas pode ser usada topicamente.



**Figura I:** Distribuição do microbiota na pele humana. (retirado da referência 9)

Os tons mais quentes representam uma maior densidade de microrganismos nas diferentes áreas do corpo humano enquanto que os mais frios representam uma menor.

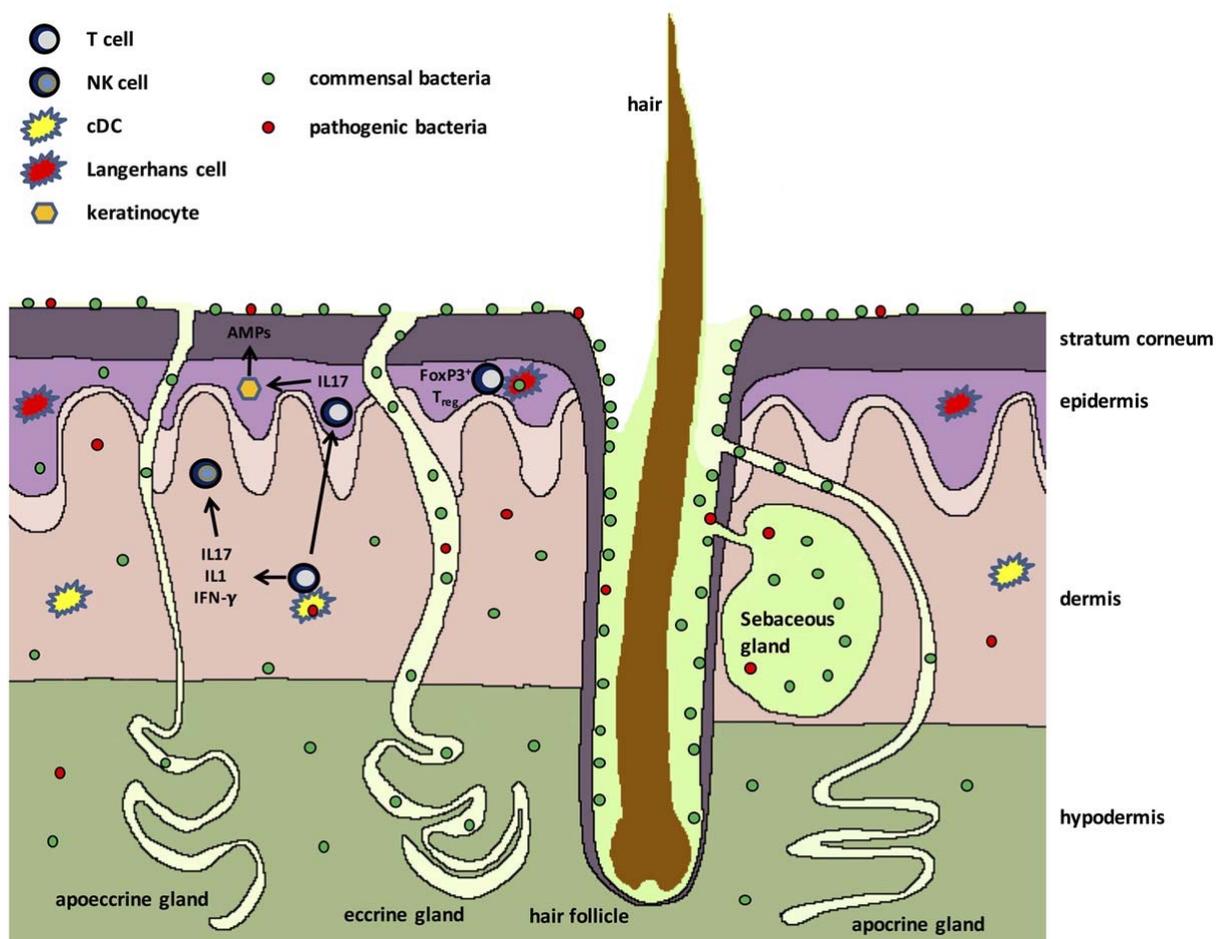


**Figura 2:** Distribuição detalhada do microbiota nas diferentes áreas da pele humana.

(retirado da referência 7)

Abundância relativa de vírus, bactérias e fungos que constituem o microbiota cutâneo em três microambientes distintos: sebáceo (azul), seco (vermelho) e húmido (verde)

Como já foi referido anteriormente o microbiota cutâneo desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase do sistema imunitário da pele. A interação entre *staphylococcus epidermis* e células de Langerhans induz a produção de linfócitos T reguladores FoxP3 específicos (Figura 3). Hipotetiza-se que estes contribuem para a redução da resposta inflamatória excessiva proveniente de uma resposta imunológica a bactérias comensais. O *S. epidermis* interage também com células dendríticas a nível da derme, que induzem a produção de interleucinas (IL-1, IL-17) e IFN- $\gamma$  por parte da população de linfócitos T, a migração destas células para a epiderme, a ativação de células *Natural Killer* e a secreção de péptidos com propriedades antimicrobianas (AMP's) como as  $\beta$ -defensinas por parte dos queratinócitos.<sup>6</sup>



**Figura 3:** Resposta imunitária induzida por *S. epidermis*. (retirado da referência 6)

Ao contrário do que era conhecido a luz do conhecimento atual, estudos recentes demonstram que existem microrganismos nas camadas mais profundas da pele. Interação entre o microbiota e células de Langerhans leva a indução de linfócitos T reguladores FoxP3 específicos

O suor humano é um líquido fresco e sem odor que apenas adquire o seu odor característico quando os seus componentes são metabolizados pela flora bacteriana. A presença de odor é causada mais especificamente pela emissão de compostos voláteis como ácidos gordos de cadeia curta (VFA).<sup>9</sup> A intensidade e tipo de odor encontra-se relacionado com o tipo de bactéria que o decompõem sendo normalmente o género *Corynebacteria* responsável pelo odor axilar, estando o odor dos pés a cargo do género *Bacillus*.<sup>9</sup> O conhecimento destes compostos voláteis é de extrema importância pois é através deles que os mosquitos identificam a qualidade e espécie dos hospedeiros.<sup>9</sup> Algumas espécies de mosquitos adaptaram-se de modo a preferencialmente alimentarem-se de humanos, estas espécies incluem os vetores da malária *Anopheles gambiae sensu stricto*, *Anopheles funestus* e o vetor do dengue *Aedes aegypti*. Este processo de escolha é completamente mediado pelo odor libertado pelos VFA, mas nem todos os compostos voláteis produzidos por bactérias atraem os mosquitos, compostos voláteis produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* não

induzem qualquer tipo de resposta, pelo que através de testes *in vitro* e *in vivo* chegou-se à conclusão que indivíduos que continham maior quantidade de *Pseudomonas spp.* na sua pele eram menos atrativos para os mosquitos enquanto indivíduos com maior quantidade de *staphylococcus spp.* tinham uma maior poder de atracção.<sup>9</sup>

A importância desta descoberta encontra-se na possibilidade de criação de novos compostos terapêuticos que impedem a formação de odor e a consequente atracção dos vetores. Estes compostos teriam assim um importante impacto numa potencial minimização da transmissão de doenças por parte destes parasitas, uma vez que mesmo com a utilização de um composto com estas características os mosquitos possuem um comportamento oportunístico pelo que é complicado prever a sua selecção de hospedeiro.<sup>9</sup>

## Vaginal

O microbiota vaginal desempenha um papel essencial na manutenção da fertilidade na mulher adulta. No recém-nascido este faz parte da colonização inicial que por sua vez contribuí para o desenvolvimento do sistema imunitário e nervoso do mesmo.<sup>3</sup> Em indivíduos saudáveis a espécie *Lactobacillus* domina o microbiota vaginal em mulheres adultas. Esta composição no que diz respeito à quantidade de *Lactobacillus* é diferente de todas as outras mas é exatamente esta espécie que é completamente essencial para a manutenção da homeostasia, desde a prevenção de infeções ao auxílio da nidificação da blástula na mucosa uterina.<sup>10</sup>

A espécie *Lactobacillus* é, portanto, responsável por diversos mecanismos que impedem a proliferação de outras bactérias exógenas, um deles consiste na produção em condições anaeróbias de ácido láctico a partir dos produtos de degradação do glicogénio por parte da  $\alpha$ -Amilase, glicogénio este que é depositado na vagina devido à ação do estrogénio. O ácido láctico vai desempenhar então um papel na acidificação da vagina até um pH na ordem dos 3-4,5 gerando um ambiente inóspito para o crescimento de outras bactérias. Ao colonizar as células epiteliais desempenha também um papel passivo ao competir com os outros microrganismos pela sua posição no epitélio, mas também geram substâncias que impedem a ligação destes outros microrganismos ao epitélio e outras como as bacteriocinas que as matam. As células epiteliais vaginais também são capazes de produzir ácido láctico, embora em menores quantidades.<sup>10</sup>

O ácido láctico produzido pelas bactérias pode constituir o isómero D ou L, sendo que o isómero D é responsável pela *down regulation* da *matrix metalloproteinase (MMP)-8* devido à ação que exerce no seu indutor. Durante a gravidez, esta proteína é capaz de

degradar uma película de muco que fecha o colo do útero impedindo a comunicação entre o útero e a vagina com conseqüente obstáculo à entrada de bactérias. Uma proporção elevada de D- ácido láctico é, portanto, essencial para diminuir a probabilidade de entrada de bactérias no útero, que poderiam implicar complicações durante a gravidez. O ácido láctico possui também propriedades que promovem a autofagia, devido a inibição da produção de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), aumentando a eliminação de organelos e proteínas disfuncionais bem como a eliminação de agentes patogênicos intracelulares.<sup>10</sup>

Estudos recentes demonstraram existir uma relação de casualidade entre o estado de stress e a população do microbiota vaginal. Sabe-se que o stress leva a uma diminuição da população de *lactobacilli* e a uma produção aumentada de noradrenalina. Estas alterações são conseqüências da secreção de CRH por parte do hipotálamo, que por sua vez vai causar a libertação de noradrenalina por parte das terminações nervosas simpáticas durante estados de stress. A noradrenalina uma vez presente na circulação sistêmica gera uma resposta a nível dos recetores vaginais e aumenta a probabilidade de ser gerada uma resposta imunitária pro-inflamatória, por exemplo aumentando o desconforto causado por uma possível infeção vaginal ou no caso de uma gravidez podendo afetar o desenvolvimento do feto e levar a um parto imaturo.<sup>10</sup> A noradrenalina é também produzida localmente nas células epiteliais, potenciando ainda a resposta imunitária pro-inflamatória de origem sistêmica.

## Gravidez

Durante a gravidez o microbiota sofre mudanças profundas devido à ocorrência de alterações hormonais e imunológicas. Estas mudanças, ao contrário das que ocorrem em certas patologias como a síndrome metabólica ou a diabetes *mellitus*, não são sinónimo de disbiose mas pelo contrário, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento saudável do feto e na manutenção de uma gravidez sem riscos.<sup>11</sup>

No intestino materno a quantidade e a diversidade do microbiota aumenta, mas as diferenças inter individuais diminuem, sendo uma exceção o género *faecalibacterium*, responsável pela produção de butirato (SCFA) que possui efeitos anti-inflamatórios, cuja quantidade diminui. O microbiota intestinal durante a gravidez também se encontra relacionado com várias alterações que ocorrem durante este período, tais como o aumento de peso materno conseqüência do aumento de absorção de glucose e ácidos gordos, a secreção de ANGPTL4 (Angiopietin-like 4 protein), a indução de vias catabólicas e a estimulação do sistema imunitário, estimulação essa que por sua vez se pensa ser de grande importância para uma posterior diminuição da incidência de doenças autoimunes e alergias.

Na vagina a quantidade de *Lactobacillus* sofre um aumento o que gera uma diminuição do pH vaginal, que constitui uma barreira contra a entrada de microrganismos patogênicos. A nível da cavidade oral ocorre apenas um aumento geral da quantidade de microrganismos, não havendo um impacto conhecido deste aumento na gravidez.<sup>11</sup>

À luz do conhecimento atual existe um consenso em relação à presença de microrganismos no líquido amniótico, mas a sua presença ao nível da placenta não é consensual e exige a realização de mais estudos dado que as opiniões divergem bastante entre estudos, alguns indicam que foram capazes de identificar bactérias outros indicam que estes casos se tratam apenas de contaminações provenientes da flora vaginal e como tal podem constituir um perigo para a gravidez.<sup>11</sup>

## Neonatal

Durante o período neonatal e durante a infância o microbiota intestinal desempenha um papel essencial, sendo responsável pelo adequado desenvolvimento e regulação do sistema nervoso e imunitário. Um episódio de disbiose durante este período poderá ser especialmente prejudicial e resultar em sequelas a curto e longo prazo, tais como o aparecimento de doenças autoimunes ou um aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças crónicas durante a vida adulta. Atualmente foram realizados poucos estudos que abordem esta temática em específico, pelo que mais estudos são necessários para estudar e compreender estas correlações.<sup>4</sup>

Todo este processo de regulação do sistema neuro-imune é controlado pelo microbiota intestinal e constitui um dos componentes do *brain-gut axis* que como o nome indica se trata de uma rede de informação bidirecional entre o cérebro e o intestino que consiste numa comunicação descendente do cérebro sobre as funções motoras, sensoriais e secretoras do trato gastrointestinal e outra no sentido ascendente do intestino sobre as funções cerebrais mais especificamente sobre o hipotálamo e a hipófise que são responsáveis pelas emoções e pela resposta ao stress. De uma maneira mais simples, o que sucede é que uma pessoa nasce com uma predisposição genética para possuir uma certa composição no seu microbiota e por sua vez o microbiota regula a expressão dos genes dessa pessoa.<sup>4</sup>

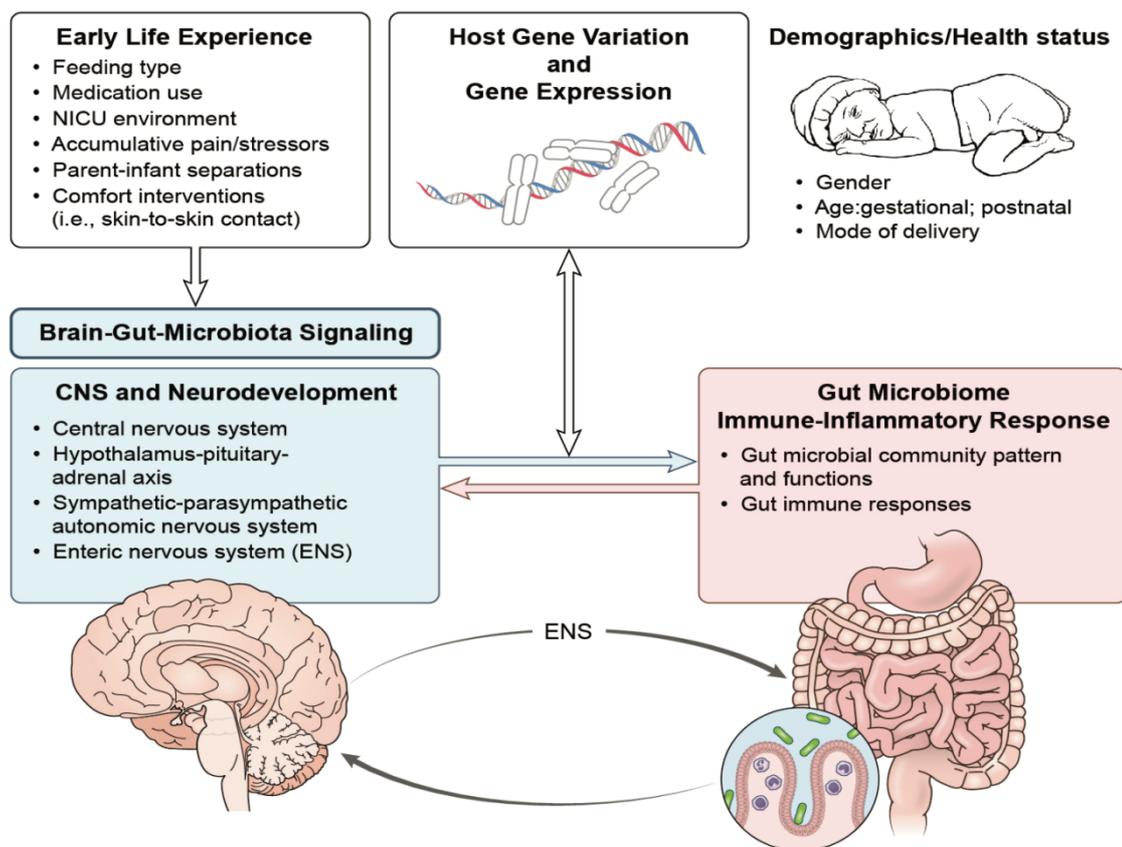
Inúmeros fatores podem afetar o microbiota durante esta fase inicial da vida tais como, tipo de parto, alimentação, medicação, ambiente hospitalar, episódios de stress, genética, entre outros, durante os próximos parágrafos o impacto destes fatores sobre o microbiota vai ser abordado.<sup>4</sup>

Normalmente recém-nascidos alimentados com leite materno são inicialmente colonizados por anaeróbios facultativos e de seguida por anaeróbios estritos, incluindo *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium* enquanto que bebés que nascem prematuros apresentam níveis reduzidos de anaeróbios estritos e elevada quantidade de *Enterobacteriaceae* e de *Enterococcaceae*. Diversos estudos indicam que este atraso na colonização dos anaeróbios estritos pode impedir o desenvolvimento de um sistema imunitário maduro permitindo uma mais fácil colonização do intestino por agentes patogénicos. O tipo de parto também influencia o tipo de microbiota com que uma criança nasce. Crianças que nascem por parto natural possuem um microbiota intestinal semelhante ao microbiota vaginal que inclui entre outros, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Eschericia coli* enquanto que crianças nascidas por cesariana possuem um microbiota mais semelhante a aquele existente na pele e composto por microrganismos presentes no ambiente envolvente. A exposição ao líquido amniótico também influencia o microbiota numa fase pré-natal.<sup>4</sup>

O leite materno desempenha também um papel elementar no desenvolvimento do microbiota intestinal do recém-nascido, introduzindo probióticos e prebióticos, fornecendo assim proteção contra agentes patogénicos (Figura 4). Géneros normalmente presentes incluem *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Clostridium*. A presença destes géneros microbianos foi comprovada quer no leite materno quer nas fezes dos seus recém-nascidos confirmando assim a hipótese de a sua transmissão ser vertical. Esta composição, no entanto, flutua com o tempo e é influenciada pela genética e peso da mãe. Estes fatores suportam a tese de que, sempre que possível, é essencial alimentar as crianças com o leite materno ao invés de preparados, uma vez que crianças alimentadas com leite materno apresentam uma maior diversidade de microbiota e apresentam uma maior abundância de *Clostridiales* e de *Lactobacillales* enquanto que crianças alimentadas com preparados apresentam um microbiota dominado por *Enterobacteriales*. Este aumento de diversidade pensa-se estar associado a uma maior proteção dos recém-nascidos contra doenças como a enterocolite necrosante que ocorre mais frequentemente em recém-nascidos muito prematuros. Outra das potenciais razões para a maior incidência desta patologia neste grupo é porque mães que dão à luz filhos prematuramente produzem leite com uma composição diferente - maior teor proteico, lipídico e energético, mas possui menor diversidade de prebióticos como os *HMO*, o terceiro composto mais abundante no leite materno, estes oligossacáridos promovem o desenvolvimento do microbiota pelo que desempenham um papel indireto em inibir o crescimento de agentes patogénicos.<sup>4</sup>

Diferentes tipos de medicação como os antibióticos têm grande impacto no microbiota, causando disbiose, que se traduz numa perda de diversas *phylos* essenciais o que

por sua vez leva a alterações metabólicas e à proliferação de microrganismos patogênicos no intestino. A administração de antibióticos trata-se de um procedimento praticamente universal em qualquer maternidade especialmente durante a abordagem de bebês prematuros, mas também são administrados frequentemente às mães destes recém-nascidos. A administração de terapêuticas antibióticas nestas situações são controversas e devem ser apenas realizadas quando realmente necessárias pois os recém-nascidos no final do ciclo de antibioterapia podem encontrar-se mais vulneráveis à colonização por microrganismos do que se encontravam inicialmente. Outros medicamentos conhecidos também por reduzir a diversidade do microbiota intestinal são os *H2RB*, usados para reduzir os níveis de acidez gástrica dos recém-nascidos.<sup>4</sup>



**Figura 4:** Regulação e desenvolvimento do microbiota em recém-nascidos. (retirado da referência 5)

Diversos fatores influenciam o correto desenvolvimento do microbiota neste período inicial da vida, tais como:

Tipo de alimentação (leite materno/leite em pó)

Tipo de parto (parto natural/cesariana)

Medicamentação administrada (antibióticos)

Ambiente na unidade de cuidados de saúde, especialmente importante no caso de prematuros.

# Modulação do microbiota intestinal

O microbiota existente no nosso trato gastrointestinal é composto por um diverso número de microrganismos incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus. Existe uma grande controvérsia acerca de qual é a composição apropriada do microbiota intestinal humano, sobretudo porque existe uma variabilidade interindividual elevada em termos de abundâncias microbianas e porque as proporções relativas dos nossos micróbios intestinais são altamente influenciadas por fatores ambientais, tais como os padrões alimentares, entre outros. Adicionalmente, o microbiota intestinal é composto por formas autóctones, que colonizam a mucosa intestinal, e microbiota transitório que faz parte dos produtos alimentares ingeridos. Estima-se que o microbiota intestinal de cada indivíduo compreende mais de 100 espécies diferentes. Até agora, já foram identificadas cerca de 1500 espécies diferentes que integram o microbiota intestinal humano. Este é constituído por um total de  $10^{13} - 10^{14}$  células, o que representa um número cerca de dez vezes maior que o representado pelas células eucariotas.

Diferentes funções são associadas ao microbiota intestinal. Dentro destas funções, destacam-se a manutenção da barreira epitelial, a inibição da colonização por parte de agentes patogénicos da mucosa intestinal, modulação e maturação do sistema imunitário, degradação de compostos de origem glucídica - que de outra maneira não seriam degradados - e produção de diferentes metabolitos como vitaminas (vitaminas K e B) e SCFA's (Ácidos Gordos de Cadeia Curta). Nesta revisão pretende-se abordar os mecanismos moleculares na base destes processos.<sup>3</sup>

## Fatores Externos

### Dieta (Pro e Prebióticos)

Um prebiótico define-se como uma substância alimentícia que beneficia o hospedeiro estimulando o crescimento e a atividade de uma certa estirpe ou estirpes de bactérias no cólon, exercendo assim um efeito benéfico na saúde do mesmo. Um probiótico por sua vez, constitui uma estirpe ou estirpes de microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas contribuem para o bem-estar da pessoa.<sup>3</sup>

Os microrganismos probióticos mais frequentemente usados em nutrição humana são determinadas estirpes pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, bem como estirpes do género *Propionibacterium* e certas leveduras como *Saccharomyces boulardii*. Nos últimos anos, um elevado número de estudos usando modelos

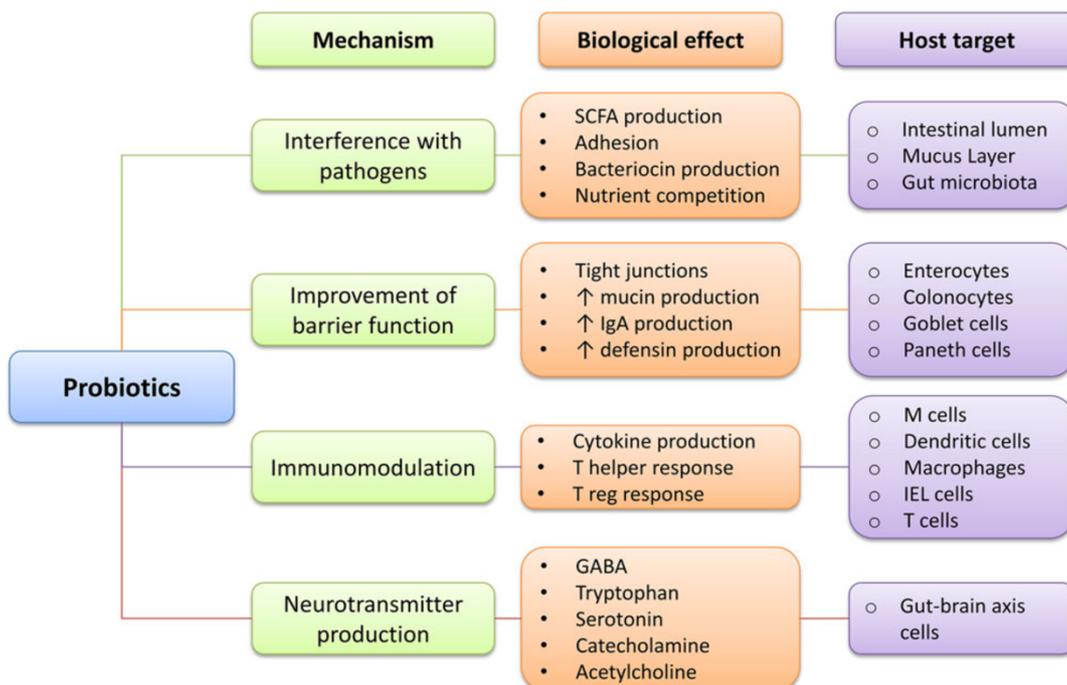
animais e intervenções clínicas, têm explorado os potenciais benefícios dos probióticos na saúde humana, principalmente na prevenção e tratamento de várias doenças.

Os probióticos exercem os seus efeitos benéficos por um de quatro mecanismos de ação (Figura 5):

- (i) Competição com bactérias patogénicas por nutrientes ou local de adesão;
- (ii) Melhoramento e manutenção da função barreira das células epiteliais;
- (iii) Imunomodulação;
- (iv) Influência noutros órgãos através do sistema imunitário ou da produção de neurotransmissores como o GABA ou a serotonina.<sup>12</sup>

Os probióticos interagem com o ser humano em três regiões do intestino, na camada mucosa, na camada epitelial e no GALT (Tecido Linfoide associado ao Intestino). A camada mucosa por sua vez subdivide-se em duas secções, uma camada externa caracterizada pela presença de peptídeos antimicrobianos e imunoglobulina A, com o propósito de limitar a colonização nesta área, e uma camada interna mais densa e compacta adjacente às células epiteliais, onde a proliferação microbiana é quase inexistente. A camada epitelial é constituída por diferentes subpopulações de células que constituem diferentes monocamadas e, no seu conjunto, o lúmen intestinal. Os enterócitos e os colonócitos que são células especializadas em absorção de nutrientes, as células de *Goblet* produtoras de mucina, as células de *Paneth* que libertam diversas moléculas com propriedades antimicrobianas, como as defensinas e a lisozima, e por fim as células M que são especializadas em transporte transepitelial. A interação dos probióticos na camada epitelial é essencial para manter a estrutura desta. A manutenção desta estrutura é conseguida através do reforço das *Tight Junctions*, junções celulares responsáveis por selar as superfícies laterais do enterócitos. A GALT constitui um dos tecidos linfoides associados às mucosas e é um dos locais de maior interação entre o microbiota e o ser humano. O GALT é composto principalmente por placas de *Peyer's* e células plasmáticas. As placas de *Peyer's* são zonas no GALT especializadas em deteção de antigénios. Nele encontram-se células apresentadoras de antigénios, tais como as células dendríticas ou macrófagos, que interagem com os linfócitos B e T de modo a desencadear uma resposta imune a um determinado antigénio. Essa resposta imune pode ser efetora (Th1, Th2 ou Th17) ou reguladora (Treg). A resposta Treg esta diretamente associada à manutenção da homeostase intestinal e a ausência de resposta imunitária contra as bactérias comensais, sendo por isso responsável por manter um estado de baixa inflamação da mucosa intestinal. Alguns probióticos, como o género *Lactobacillus*, ao produzir peptídeos imunomodulatórios como o peptídeo STp também contribuem para a manutenção de um estado de baixa inflamação através da indução de citocinas anti-

inflamatórias nas células dendríticas. Esta resposta é especialmente importante em doenças inflamatórias do intestino tal como a doença de Crohn.<sup>12</sup>



**Figura 5:** Principais mecanismos de ação dos probióticos. (retirado da referência 12)

Representado neste esquema encontra-se os principais mecanismos de ação dos probióticos (verde) em conjunto com o efeito fisiológico que causam no organismo (laranja) e as células alvo que eles influenciam (roxo)

Inúmeras doenças intestinais estão relacionadas com períodos de disbiose do microbiota intestinal. Diversos estudos demonstram o importante papel que os probióticos podem ter no sistema digestivo, tendo efeitos significativos no alívio dos sintomas de várias doenças e contribuir de forma benéfica para a saúde. Neste segmento abordar-se-á os benefícios dos probióticos em diversas doenças do trato gastrointestinal, para as quais a restauração do balanço microbiano através do uso de probióticos tem evidenciado efeitos benéficos para a saúde na prevenção ou tratamento da doença (Figura 6).<sup>12</sup>

(i) Diarreia infecciosa.

Dos vários microrganismos que causam diarreia aguda, os rotavírus são os mais comuns na população pediátrica. A diarreia aguda é também frequente entre viajantes, nos quais as *Escherichia coli* enterotoxigénicas são particularmente comuns. Outras bactérias patogénicas importantes causadoras de diarreia infecciosa são membros dos géneros

Salmonella, Campylobacter e Shigella. Os probióticos neste caso atuam competindo por nutrientes e local de fixação na mucosa intestinal, tornando o conteúdo intestinal ácido, produzindo diversas substâncias químicas e aumentando a resposta imunitária específica e não específica. Nesta patologia são usadas predominantemente as espécies Lactobacillus rhamnosus GG e Saccharomyces boulardii. A utilização destes probióticos deve ser sempre realizada em conjunto com terapia de hidratação. Os probióticos também podem ser usados como prevenção desta patologia especialmente por viajantes, mas de momento não existem estudos em número suficiente tornando os mesmos pouco conclusivos.<sup>12</sup>

(ii) Diarreia associada ao uso de Antibióticos (AAD).

O uso de antibióticos, como já foi referido anteriormente, causa distúrbios de grande magnitude no microbiota pelo que por vezes pode ser o agente causador de episódios de diarreia. Este processo deve-se, na maioria dos casos e principalmente, ao crescimento desproporcionado de Clostridium difficile que causa a chamada diarreia associada ao C. difficile. Existem opiniões díspares entre as várias agências sobre se espécies como Lactobacillus GG e Saccharomyces boulardii devem ser usadas para o tratamento desta patologia pois não existem evidência científica suficiente que comprove o seu benefício, existe contudo, uma opinião uniforme de que estas estirpes podem ser usadas como tratamento preventivo em crianças e adultos.<sup>12</sup>

(iii) Doenças Inflamatórias do Intestino (IBD).

Diversas doenças inflamatórias do intestino como a doença de Crohn ou a Colite ulcerosa, são caracterizadas por uma desregulação do sistema imunitário causando inflamação do trato gastrointestinal. Pensa-se que uma desregulação do microbiota, ou uma inadequada resposta do hospedeiro a essa desregulação, possa ter um papel crítico na fisiopatologia destas doenças. Os probióticos são usados então com o objetivo de modular o microbiota e com isto regular o sistema imunitário, apesar de diversos estudos não conseguirem indicar qualquer benefício no uso de probióticos neste grupo de patologias, diversos médicos especialistas usam-nos, pois afirmam que conseguem verificar melhorias como na prevenção de pouchitis.<sup>12</sup>

(iv) Síndrome do Cólon Irritável (IBS).

A Síndrome do Cólon Irritável é caracterizada por desconforto abdominal ou dor e função intestinal alterada. Embora as causas da IBS não estejam ainda completamente

compreendidas, existe uma crescente evidência que sugere um potencial papel do microbiota intestinal na sua patofisiologia.

Na síndrome do cólon irritável, os probióticos podem ser usados com o objetivo de aliviar os sintomas e desconforto causados pela patologia.<sup>12</sup>

(v) Infeção por *Helicobacter pylori*

Em infeções por *Helicobacter pylori* os probióticos, por si só, não são o suficiente para erradicar a infeção, mas quando usados em conjunto com uma terapia antibiótica aumentam a velocidade de resolução da infeção para além de ajudarem a prevenir os efeitos secundários provenientes da toma dos antibióticos.<sup>12</sup>

(vi) Intolerância à Lactose.

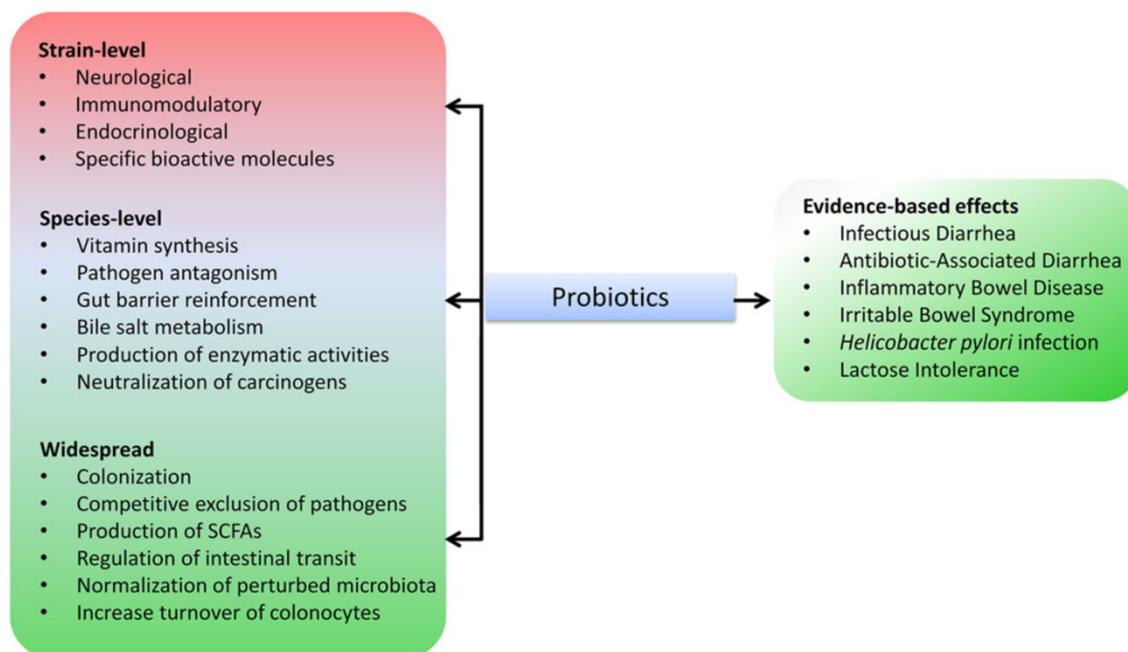
Uma grande parte da população mundial apresenta baixos níveis da enzima  $\beta$ -galactosidase (lactase) na mucosa do intestino delgado. Estas pessoas sofrem sintomas de intolerância quando o leite (lactose) ou os seus derivados se encontram presentes nas suas dietas.

Probióticos que contenham bactérias capazes de degradar a lactose são potencialmente benéficos para todos aqueles que possuem um défice de  $\beta$ -galactosidase a nível do intestino delgado. O consumo de iogurtes ou leites fermentados contendo estes microrganismos que providenciam atividade  $\beta$ -galactosidásica microbiana aumentam, portanto, a tolerância e digestibilidade da lactose e reduzem o desconforto associado ao consumo de lactose.<sup>12</sup>

Apesar de todos estes efeitos benéficos gerados pelo uso de probióticos estudos recentes revelaram que eles não estão necessariamente ligados a uma mudança na população bacteriana, mas sim a mudanças metabólicas na população existente, um exemplo disto é a estirpe *Bifidobacterium bifidum* que quando criada em conjunto com *Bifidobacterium breve* aumenta a sua atividade metabólica. Estes estudos são concordantes com outra descoberta que indica que muitos dos probióticos usados não colonizam o intestino, sendo evacuados após exercerem os seus efeitos.<sup>12</sup>

Ainda existe muito por saber sobre os mecanismos por trás dos efeitos benéficos dos probióticos. Para muitos deles é ainda necessária a realização de ensaios clínicos ou número limitado de ensaios existentes não conseguem indicar um benefício objetivo no seu uso. Apesar de à luz do conhecimento atual ainda existirem diversas lacunas na nossa compreensão sobre os mecanismos e potenciais efeitos dos probióticos espera-se que no

futuro o nosso conhecimento sobre as moléculas responsáveis por estes efeitos irá aumentar e permitirá a criação de terapêuticas mais eficazes.<sup>12</sup>



**Figura 6:** Efeitos benéficos atribuídos aos probióticos. (retirado da referência 12)

Representado à esquerda encontram-se os efeitos benéficos atribuídos a probióticos de acordo com a *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*, alguns estão presentes em várias estirpes como a produção de SCFA's outros como a imunomodulação são específicos de certas espécies. À direita encontram-se diversas patologias onde o uso de probióticos tem efeitos benéficos.

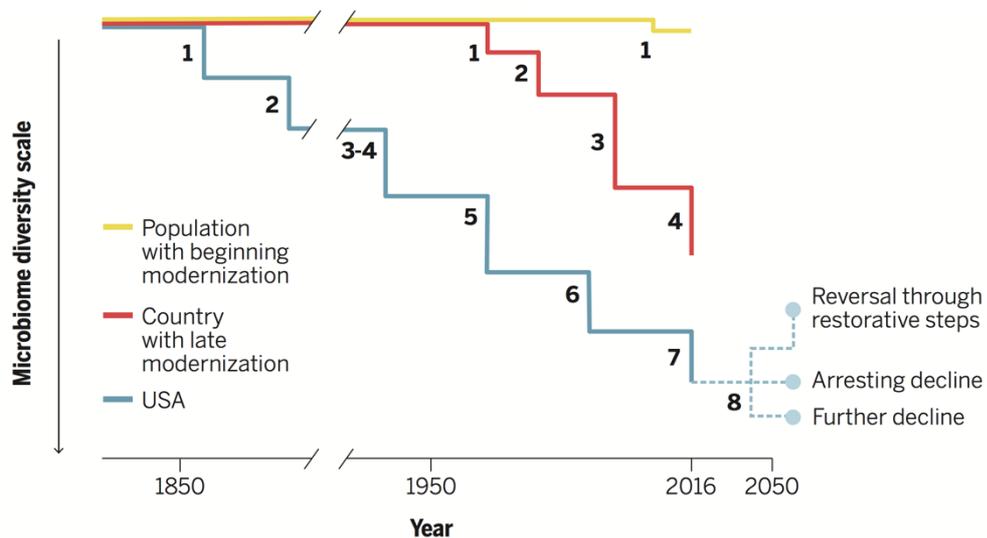
## Antibióticos

Há mais de 70 anos, desde que *Fleming* inventou a penicilina, que os antibióticos são uma ferramenta terapêutica essencial para o exercício da medicina. Em 2010 estima-se que tenham sido utilizadas mais de 70 milhares de milhões de doses individuais.<sup>13</sup>

Existe uma falsa ilusão de segurança na utilização de antibióticos. Apesar de existirem efeitos secundários a probabilidade destes ocorrerem é bastante baixa e a população em geral não se encontra ciente de que a utilização desnecessária de antibióticos tem como consequência a criação de resistências, pois esta é uma problemática que afeta a comunidade e não diretamente o indivíduo. O mesmo se sucede com os pais e a administração de antibióticos na população pediátrica, em que apesar de atualmente existir uma maior consciência por parte dos prescritores do risco para a saúde pública causados pela prescrição excessiva, a prescrição continua a ser muitas vezes realizada desnecessariamente uma vez que os pais insistem em medicar aos seus filhos pois pensam ser totalmente seguro. Este comportamento observa-se também e intensifica-se até com a criação de animais onde

pouco depois da descoberta dos antibióticos os criadores descobriram que adicionar estes em baixas doses às rações e água dos animais promovia um crescimento mais rápido dos mesmos. Para além disso comprovou-se também de que quanto mais cedo ocorresse a exposição mais precoce seria o efeito, isto demonstra o quão grande é o efeito que os antibióticos causam no metabolismo.<sup>13</sup>

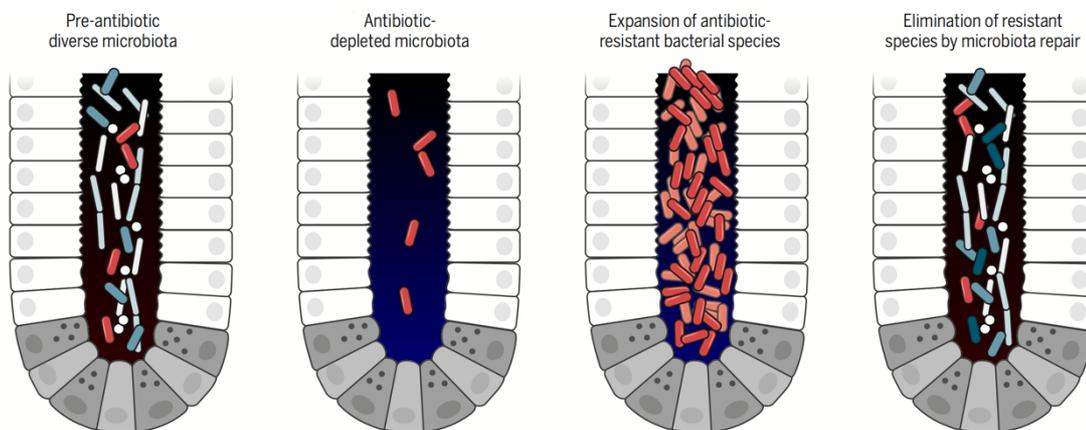
Estudos recentes têm tentado estabelecer analogias entre o efeito dos antibióticos nos animais e nas pessoas durante os seus primeiros anos de vida. Chegou-se à conclusão de que a exposição neste período de tempo aumenta o risco de desenvolver diversas doenças como obesidade, diabetes tipo 1 e 2, doenças inflamatórias do intestino, doença celíaca, alergias e asma. Este fenómeno ocorre, pois, o microbiota ainda numa fase inicial de desenvolvimento é alvo de uma enorme perturbação, o que causa a perda de diversas espécies e conseqüentemente afeta o normal desenvolvimento do sistema imunitário. Infelizmente é neste período perinatal que se verifica o maior uso de antibióticos. Este impacto supõe-se que se transmita de geração em geração visto que recebemos parte do nosso microbiota das nossas mães, o que ajudaria a explicar o facto de a diversidade do microbiota ter vindo a diminuir ao longo dos anos desde a introdução do saneamento básico e dos antibióticos (Figura 7).<sup>13</sup>



**Figura 7:** Declínio da diversidade microbiota ao longo dos anos em diferentes populações. (retirado da referência 13)

O seguinte gráfico ilustra que o declínio da diversidade do microbiota nos Estados Unidos iniciou-se simultaneamente com a introdução inicial de cuidados básicos de saneamento (filtração da água) e o início do uso de antibióticos. A escala é arbitrária e cada número representa uma geração.

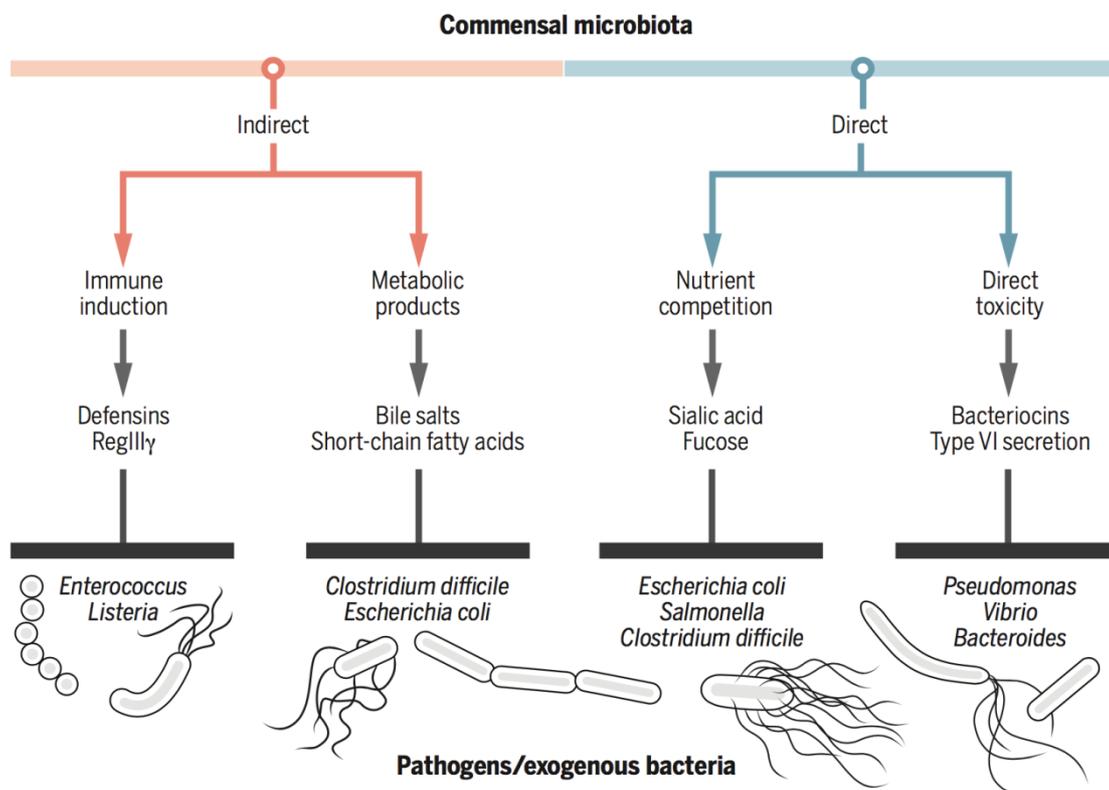
Esta toma excessiva de antibióticos acaba por ter o efeito contrário ao pretendido no próprio indivíduo, não só o dano causado no microbiota intestinal deixa a pessoa mais vulnerável a futuras infecções, mas também porque seleciona os microrganismos que são resistentes à sua própria ação (Figura 8). Um ponto importante de realçar é que um antibiótico que contribua para a expansão de uma determinada estirpe resistente não tem de ser necessariamente aquele que a afeta, mas sim um que elimine as espécies que dificultam que esta colonize a mucosa intestinal. Esta tarefa está normalmente a cargo de espécies que são estritamente anaeróbias, sendo que está comprovado que a eliminação destas espécies leva automaticamente ao aumento da colonização por parte de enterococos vancomicina resistentes (VRE).<sup>14</sup>



**Figura 8:** Tratamento com antibióticos reduzem a diversidade do microbiota e selecionam estirpes resistentes. (retirado da referência 14)

A administração de antibióticos permite a seleção de espécies bacterianas resistentes aos próprios, permitindo que estas mais facilmente se multipliquem e atravessem a barreira epitelial intestinal, estes danos podem ser corrigidos através da administração de espécies bacterianas comensais.

Estes mecanismos de resistência à colonização por diversas espécies como VRE, *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium difficile* são normalmente de natureza indireta, quer seja pela indução de fatores antimicrobianos como o *RegIIIγ*, uma lecitina do tipo c que mata seletivamente bactérias gram positivas, ou modificando substâncias endógenas como os sais biliares tornando-os tóxicos para estas, mas estes métodos também podem ter uma natureza mais direta quer seja pela secreção de bacteriocinas ou pela depleção de nutrientes (Figura 9).<sup>14</sup>



**Figura 9:** Métodos de resistência a colonização por parte do microbiota. (retirado da referência 14)

As bactérias comensais conseguem ativar mecanismos imunes ativos na mucosa, causando uma depleção de nutrientes ou uma produção de substâncias diretamente tóxicas para bactérias patogênicas, gerando assim um alto nível de resistência contra a colonização por parte de bactérias exógenas.

Este consumo excessivo de antibióticos deve ser considerado um assunto do foro da saúde pública da mais alta prioridade e a procura de soluções e a consciencialização da população em geral deve ser realizada o quanto antes. Apesar de todos os esforços que possam estar a ser feitos a este respeito, existem já diversas espécies resistentes e outros efeitos adversos que podem apenas ser atenuados, pois as estirpes resistentes que existem atualmente vão continuar a sê-lo e continuarão a evoluir por elas próprias, apesar de a intervenção humana acelerar este processo se não houver uma mudança de comportamentos.

## Fatores Internos

### *Brain Gut Axis*

O *brain gut axis* é constituído por diversos componentes como o sistema nervoso central, o sistema endócrino e imunitário, o eixo hipotálamo-hipófise-glândulas suprarrenais, o sistema nervoso autónomo e entérico e o microbiota intestinal. Entre todos estes órgãos gera-se uma rede de comunicação bidirecional em que o SNC consegue influenciar o microbiota e este consegue influenciar o SNC (Figura 12).<sup>4</sup>

O SNC controla o trato GI e o ENS através do ANS mais concretamente através dos sistemas nervosos simpático e parassimpáticos e também através do eixo HPA. Esta modulação ao nível do trato GI controla a secreção de ácido, produção de bicarbonatos e muco, contração do músculo liso, permeabilidade do intestino e a resposta imunitária. A regulação da produção de muco é essencial para a manutenção da camada mucosa do intestino onde habita grande parte do microbiota.<sup>15</sup>

O microbiota por sua vez consegue comunicar com o ENS, o cérebro e entre si através da secreção de diversos metabolitos como SCFAs, GABA, precursores do triptofano, serotonina, catecolaminas e citocinas. Esta comunicação normalmente é transmitida através de duas vias, por via neurócrina através do nervo vago e da espinal medula ou por via endócrina modulando órgãos fora do trato GI através de ramificações do nervo vago na veia porta por exemplo.<sup>15</sup>

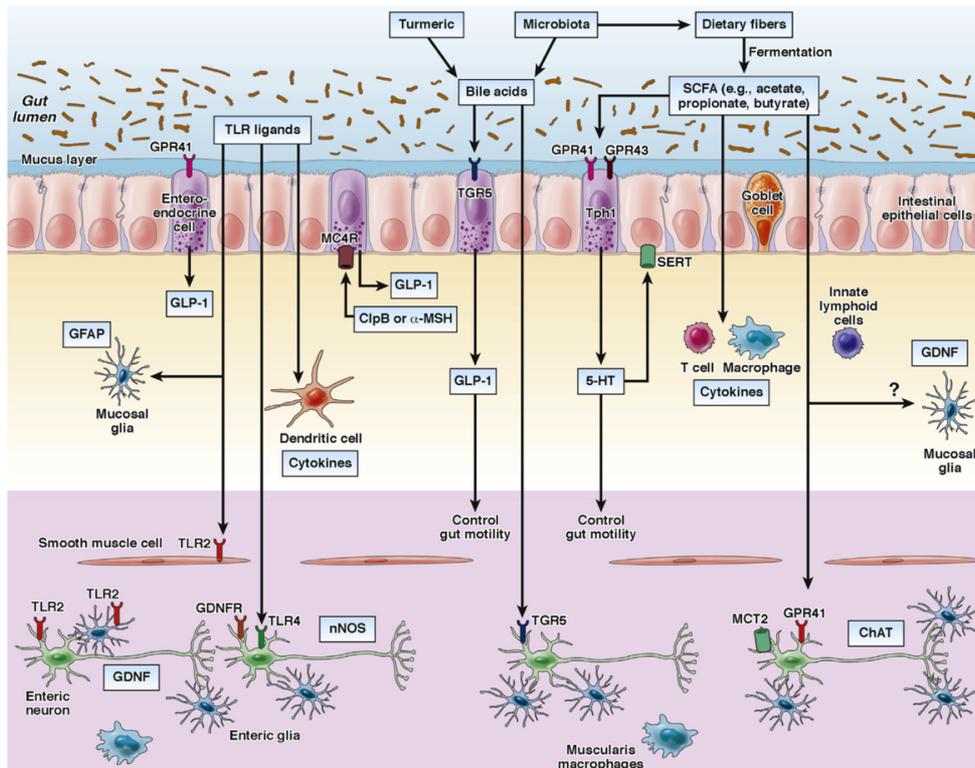
Os SCFAs são um de muitos metabolitos provenientes de bactérias que desempenham um papel essencial na homeostase (Figura 10). Estes são formados através da fermentação de fibras e hidratos de carbono como o butirato e tem diversos efeitos na fisiologia humana como a redução de apetite, diminuição da resistência a glucose, modulação da função dos linfócitos e neutrófilos e aumento da produção de serotonina através da sua acoplação e consequente ativação de recetores associados a proteínas G como o *GPR41* e *GPR43* que por sua vez causam um incremento da expressão do *Tph1* presente nas EC. No epitélio intestinal, outro fator responsável pela disponibilidade da serotonina no intestino é o *SERT* expressado pelas células do epitélio intestinal, esta expressão também é regulada pelo microbiota, mas o processo pelo qual é regulado não é totalmente conhecido. A ativação do *GPR43* resulta também na secreção de uma hormona denominada GLP-I que entre outras funções desempenha um papel na regulação do transito intestinal.<sup>15, 16</sup>

O microbiota também desempenha um papel na conversão de ácidos biliares primários em secundários, estes por sua vez conseguem ativar o TGR5 (recetor associado a proteína G) que é expressado em neurónios do ENS e em EC e desempenha também um papel na regulação do trânsito intestinal aumentando os movimentos peristálticos.<sup>16</sup>

Existem, portanto, diversos mecanismos pelos quais o microbiota regula o trato GI e o cérebro e o contrário também sucede, portanto quaisquer alterações neste sistema no sentido de causar disbiose são capazes de afetar esta comunicação e levar a um estado patológico.

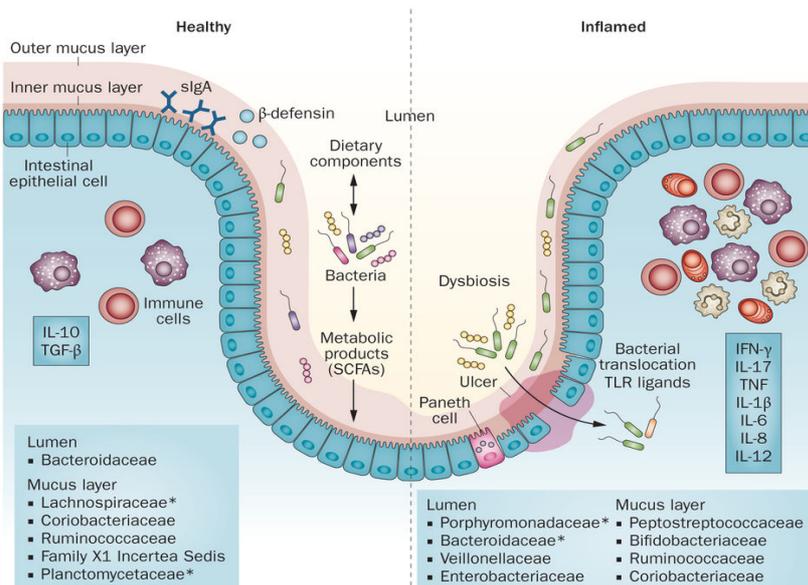
Caso esta perturbação ocorra ainda num período inicial de desenvolvimento pode afetar a correta evolução do sistema nervoso, da interação intestino-cérebro, e do eixo HPA como já foi referido anteriormente, caso suceda num individuo já adulto pode causar

aumento da permeabilidade intestinal por vezes induzido também por stress, facilitando assim a passagem de microrganismos e induzindo uma resposta imune inflamatória (Figura 11).<sup>15</sup>



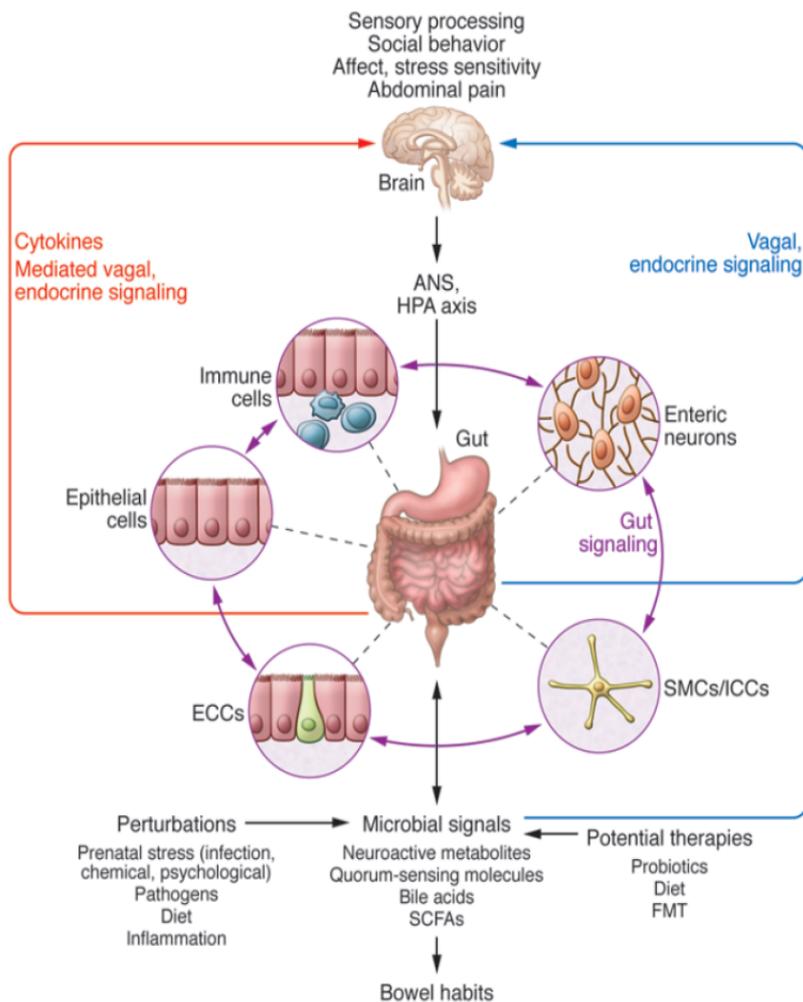
**Figura 10:** Atividade de diferentes tipos de células no intestino e a sua regulação pelo microbiota. (retirado da referência 16)

O microbiota controla a atividade de múltiplos tipos de células na parede intestinal, incluindo o ENS. Os SCFA's ativam os recetores GPR41 e 43 em células enterocromafinas no epitélio intestinal resultando numa produção aumentada de GLP-I e serotonina.



**Figura 11:** Lúmen intestinal em condições fisiológicas normais e num estado inflamatório. (retirado da referência 17)

Comunidades bacterianas complexas existem tanto no lúmen como na camada mucosa que possui uma camada interior praticamente estéril onde defensinas se concentram e formam um escudo anti microbial.



**Figura 12:** Rede de comunicação bidirecional entre o cérebro e o intestino. (retirado da referência 15)

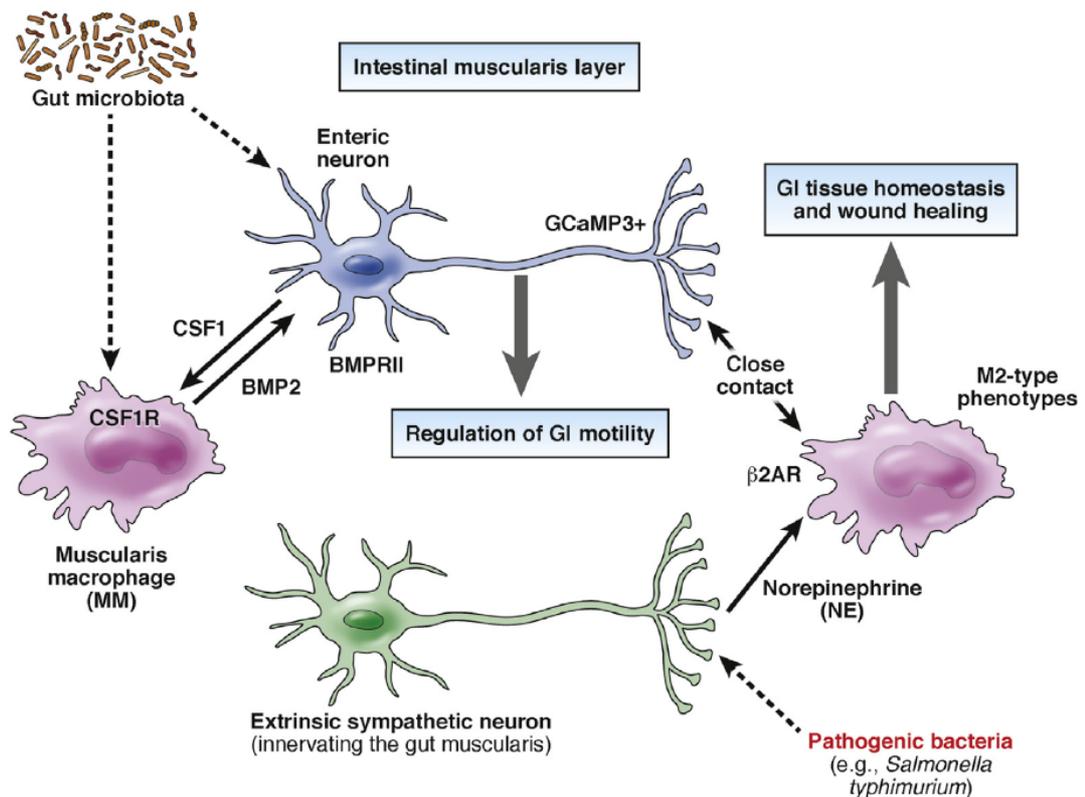
O cérebro comunica com o intestino através do ANS e do eixo HPA. Esta comunicação tem como alvo uma rede de células especializadas na parede intestinal que funciona como interface entre o microbiota e o lúmen. O microbiota por sua vez encontra-se em constante comunicação com esta interface e o *output* desta informação é transmitida ao cérebro por várias vias aferentes, de natureza neurocrina (nervo vago e aferentes da espinal medula) ou endócrina (citoquinas e metabolitos).

## Sistema imunitário

O trato GI constitui o local no corpo humano que possui a maior concentração de células do sistema imunitário, especialmente de macrófagos que desempenham um papel essencial na imunidade inata. Na mucosa intestinal existem um tipo específico de macrófagos, os *muscularis macrophages* (MMs) que estão em contato com as células do ENS e cujo desenvolvimento está dependente do CSFIR, um recetor para macrófagos que regula o sistema mononuclear fagocitário. Estes macrófagos entre outras funções são responsáveis pelo controlo da motilidade intestinal, a sua função por sua vez é modulada pela  $BMP^2$  que é secretada pelos próprios e ativa os neurónios entéricos, estes ativam um recetor denominado *BMP Receptor type II* (BMPRII) uma componente do  $BMP^2$  que produz CSFIR que como já foi dito anteriormente é essencial para o desenvolvimento dos MM. Pensa-se que a produção de CSFI e de  $BMP^2$  esteja dependente do microbiota intestinal pois os níveis destes variam consoante a população bacteriana, e no caso de tratamento com antibióticos os níveis de ambos diminuem.<sup>16</sup>

Uma infecção por bactérias patogênicas como *Salmonella typhimurium* causa a produção de noradrenalina por parte da camada muscular que por sua vez vai interagir com o recetor *Adrb2*, um recetor  $\beta$ -adrenérgico existente nos MM que causa uma mudança de fenótipo (fenótipo M2) nestes deixando de ser responsáveis por regular a motilidade intestinal para passarem a ser responsáveis pela manutenção da homeostase dos tecidos e pela cicatrização dos mesmos.<sup>16</sup>

Conclui-se assim que a interação entre microbiota, ENS e sistema imunitário é essencial para a manutenção da homeostase no trato GI.



**Figura 13:** Comunicação bidirecional entre o sistema imunitário e o ENS. (retirado da referência 16)

A *BMP2* proveniente dos MM regula a atividade dos neurónios entéricos (pela ativação do *BMPRII*) enquanto que o *CSF1* proveniente dos neurónios entéricos é essencial para o desenvolvimento dos MM. A produção de *CSF1* e de *BMP2* esta depende do microbiota.

Como já foi descrito várias vezes ao longo deste trabalho o microbiota desenvolve um papel essencial na modulação e correto desenvolvimento do sistema imunitário no período neonatal, isto porque as células imunitárias neonatais diferem de função das adultas pois em vez de reconhecerem antígenos e desencadear a respectiva resposta imunológica, nesta fase inicial estas aprendem a desenvolver tolerância aos antígenos presentes no seu

ambiente de modo a não desencadear respostas imunitárias contra as próprias células do corpo ou contra as bactérias comensais. Não se conhece o mecanismo em concreto que define este processo, mas pensa-se que esteja relacionado, não com uma propriedade em concreto dos linfócitos T, mas sim, do ambiente em que eles se encontram localizados. Assim sendo, desequilíbrios no microbiota neste período da vida são especialmente preocupantes pois podem gerar mais tarde doenças autoimunes se não forem resolvidos durante as duas semanas iniciais deste processo. Nestes próximos parágrafos irei descrever mais em concreto as funções do microbiota no correto funcionamento de algumas células do sistema imunitário.<sup>17</sup>

As *iNKT* são células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos bacterianos de origem lipídica de natureza exógena e endógena apresentados pela *CD1d*, uma molécula expressa em diversas células apresentadoras de antígenos.

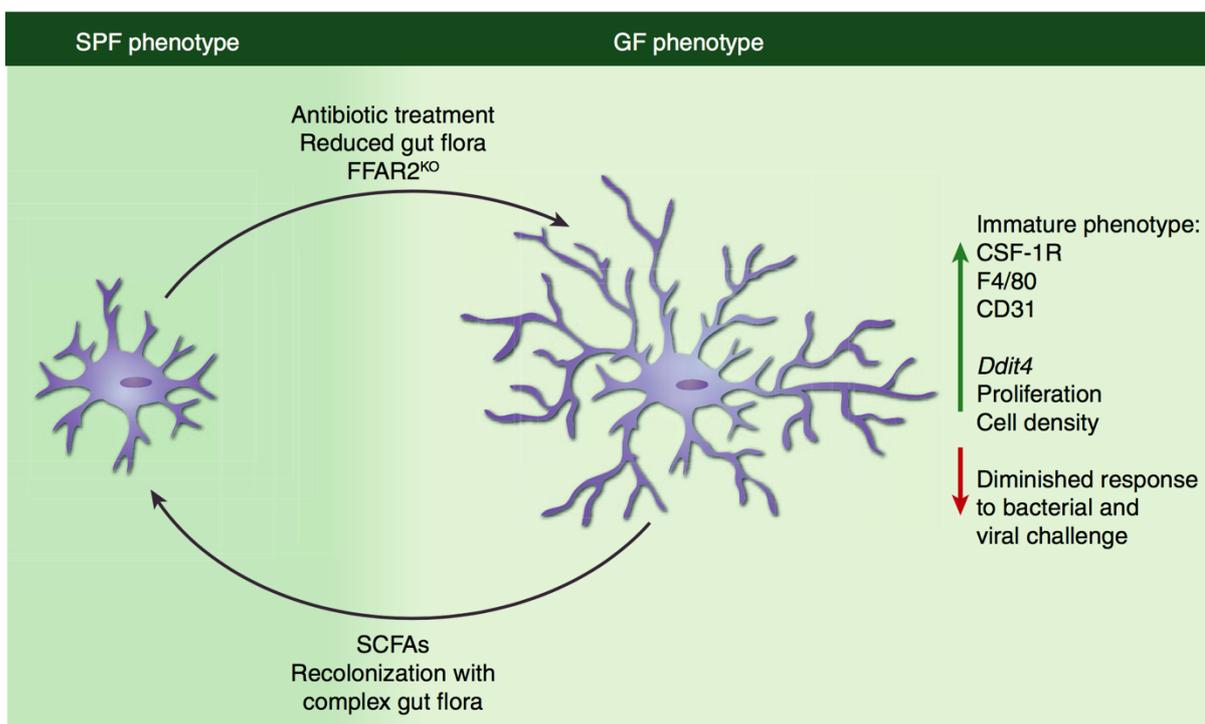
Em animais *germ free* (GF), animais criados com o intestino estéril, estas células tanto se apresentam em baixos níveis no baço e no fígado, levando a uma diminuição da resposta à presença de antígenos, como estão em níveis superiores ao normal em regiões como os pulmões e o cólon, levando a uma resposta exacerbada, o que no cólon resulta na inflamação do mesmo e nos pulmões numa maior suscetibilidade a crises de asma devido ao aumento da *Airway hyperresponsiveness* (AHR), que consiste numa contração exagerada das vias respiratórias como resposta a estímulos não específicos como variações nos níveis de histamina ou inalação de ar frio. Isto suporta a ideia de que certas espécies microbianas conseguem regular o recrutamento e proliferação das *iNKT* para os diferentes órgãos.<sup>17</sup>

As IgE são anticorpos produzidos pelos linfócitos B que desempenham um papel na resposta a alérgenos e a agentes patogénicos como helmintas ou outros parasitas. Em testes conduzidos em ratos GF chegou-se a conclusão que esta imunoglobulina se encontra em níveis superiores ao normal, causando uma maior suscetibilidade a choques anafiláticos.<sup>17</sup>

Outro tipo de células que também é largamente influenciado pelo microbiota é a microglia. A microglia é um tipo de células da neuroglia que são macrófagos do SNC. Em conjunto com os astrócitos são um elemento fundamental da resposta imune no SNC e responsáveis pela manutenção da homeostase. Estudos realizados em ratos GF demonstram que na ausência de microbiota as células da microglia expressam um fenótipo imaturo. Uma das características da microglia é que cada célula se estende apenas no seu domínio nunca havendo sobreposição de ramificações. Em ratos GF a microglia demonstra uma morfologia hiper ramificada e acompanhada por uma maior densidade de células devido a um aumento da taxa de proliferação causada por uma maior estimulação do *CSF-1R*. Esta estimulação

excessiva causa portanto sobreposição das ramificações, resultando numa rede de microglia disfuncional (Figura 14).<sup>2</sup>

Um fenótipo semelhante a este é obtido também através do uso de antibióticos ou da presença da deficiência do *FFAR2* (*Free Fatty acid receptor 2*) ou *GPR41*, um recetor associado a proteínas G.<sup>2</sup> Estes fenótipos levam a uma resposta diminuída do sistema imunitário, mas podem ser facilmente revertidos a um estado normal através da recolonização do microbiota.<sup>2</sup>



**Figura 14:** Fenótipo imaturo da microglia. (retirado da referência 3)

Em condições GF a microglia apresenta um fenótipo imaturo, disfuncional que apresenta uma morfologia hiper ramificada, que torna a rede de microglia disfuncional, acompanhada por uma maior densidade de células proveniente de uma estimulação excessiva do CSF-1R. Tratamento com antibióticos ou uma deficiência de *FFAR2* também geram este fenótipo. A recolonização do microbiota é suficiente para reverter este fenótipo para as condições fisiológicas normais

## Sistema Nervoso

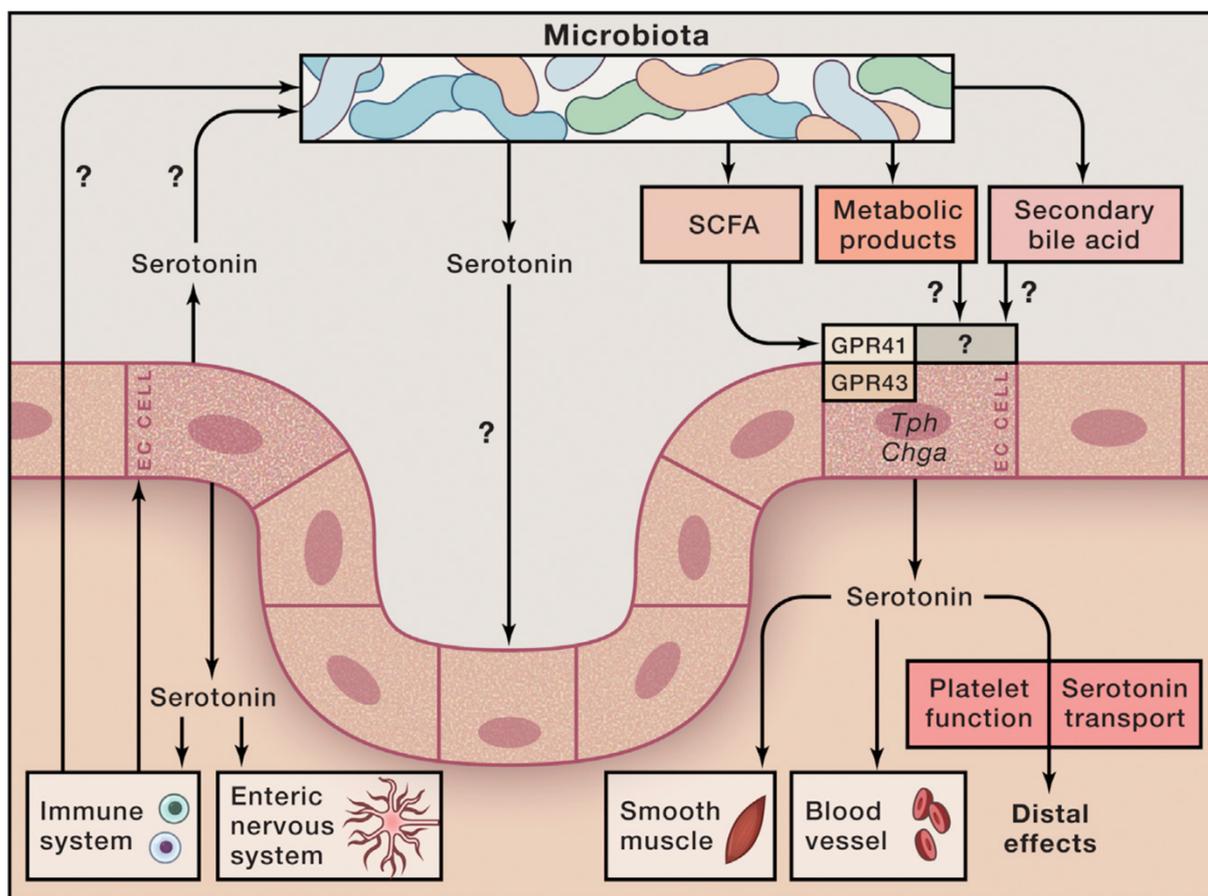
Como já foi abordado varias vezes no decorrer deste trabalho o microbiota intestinal têm um enorme impacto na manutenção da homeostase do sistema nervoso central. No decorrer deste segmento vai ser abordada a sua influência na produção e transmissão da serotonina, na expressão do *BDNF* e no *HPA*.

A serotonina é uma molécula que consegue ter os mais variados efeitos na fisiologia humana quer seja ao atuar na promoção de uma correta motilidade intestinal, da agregação

plaquetar, do desenvolvimento ósseo e da função cardíaca, como neurotransmissor ou hormona.

Grande parte da serotonina é produzida no intestino pelas células enterocromafinas (ECC) tendo sido detetado que ratos GF possuem níveis baixos desta hormona e níveis altos de triptofano em relação a espécimes com um microbiota padrão.<sup>18,19</sup>

Atualmente pensa-se que o microbiota produz diversos metabolitos como SCFA ou ácidos biliares secundários que atuam sobre as ECC e levam a transcrição da triptofano hidroxilase I (*tph1*), a enzima que define a velocidade de síntese da serotonina. Esta redundância é importante para manter a produção de serotonina na presença de eventuais flutuações na composição do microbiota. Certos estipes de microrganismos conseguem produzir serotonina por eles próprios o que nos leva a questionar se a serotonina terá algum papel no metabolismo microbiano (Figura 15).<sup>18,19</sup>



**Figura 15:** Papel do microbiota na produção de serotonina. (retirado da referência 19)

O microbiota influencia o número e função das EC's, promovendo assim a libertação de serotonina. Esta é produzida por diversos metabolitos como SCFA's. A serotonina possui diversos efeitos fisiológicos como a promoção da motilidade e função plaquetar e pode atuar quer localmente ou no desenvolvimento ósseo e na função cardíaca por transporte mediado por plaquetas.

O *BDNF* é uma proteína responsável por regular a plasticidade do cérebro, a memória e a saúde neuronal. Mais uma vez estudos em ratos GF levam a crer que o microbiota esteja envolvido na regulação da expressão do *BDNF*, pois ratos sujeitos a administração crónica de antibióticos apresentam níveis reduzidos de *BDNF* no hipocampo, que por sua vez pensa-se que esteja relacionado com dificuldades cognitivas apresentados pelos mesmos, mas não se conhece o mecanismo em concreto que regula esta interação. Baixos níveis de *BDNF* estão também associados a situações de depressão crónica, sendo aumentados pela toma de antidepressivos, pelo que naturalmente isto abriu a porta para o estudo dos efeitos de probióticos e prebióticos no tratamento desta patologia. Administração de *FOS* e *GOS* durante 5 semanas num grupo de ratos levou ao aumento dos níveis de *BDNF* produzindo um efeito antidepressivo e ansiolítico nos mesmos, o que traz credibilidade para que estes um dia possam ser usados para o tratamento da depressão. O mecanismo em concreto pelo qual estes prebióticos aumentam os níveis de *BDNF* são atualmente desconhecidos.<sup>19</sup>

O eixo *HPA* é responsável por regular a resposta fisiológica ao stress e encontra-se normalmente desregulado em situações de depressão ou outras doenças do foro psiquiátrico. O stress é percecionado pelo nosso corpo como uma situação que irá levar a uma disrupção da homeostase, a manutenção desta na presença destes fatores disruptivos leva a ativação de cascatas celulares que começam com a libertação de *CRH* também denominado por *Corticotropin releasing factor (CRF)* e acabam com a produção de glucocorticoides, mineralocorticoides e esteroides androgénicos por parte das glândulas suprarrenais levando a um estado de euforia, melhoramento dos reflexos, menor perceção da dor e maior capacidade cognitiva. Este sistema é altamente regulado por um número de sistemas endócrinos e neuronais.<sup>19,20</sup>

Mais uma vez detetou-se a influência do microbiota neste eixo através de testes usando ratos GF, estes ratos apresentavam níveis de *CRH* e de cortisona mais elevados que o normal quando deparados com situações de stress, o que leva por sua vez a uma dessensibilização dos recetores de glucocorticoides no hipotálamo comprovando de que se trata de uma sobreactivação do eixo *HPA* na ausência de um microbiota funcional. Pelo que novamente procurou-se estudar o efeito que diversos probióticos poderiam ter neste problema e chegou-se a conclusão que *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus farciminis* são capazes de regularizar a secreção de *CRH* podendo vir a ser um elemento importante no tratamento da depressão.<sup>19</sup>

# O microbiota na saúde e na doença

## Doença de Parkinson: uma doença do eixo microbiota-intestino-cérebro?

Recentemente surgiu uma hipótese emergente implicando défices do *ENS* na patogénese de doenças degenerativas, incluindo a doença de Parkinson (*PD*).

A *PD* é caracterizada pela degeneração seletiva dos neurónios dopaminérgicos na substância negra do mesencéfalo, e pela deposição anormal de  $\alpha$ -sinucleína (corpos de Lewy) nos neurónios dopaminérgicos sobreviventes, resultando nos sintomas motores característicos desta patologia.<sup>16</sup>

Contudo, uma elevada percentagem de doentes com doença de Parkinson reporta também sintomas de motilidade gastrointestinal anormal e constipação.

Curiosamente, acumulações de  $\alpha$ -sinucleína associadas à *PD* também são encontradas nos neurónios entéricos, as quais precedem o desenvolvimento dos sintomas motores em vários anos, sugerindo que o *ENS* é um local inicial de agregações de  $\alpha$ -sinucleína, que se espalham subsequentemente para o cérebro através das fibras do nervo vago.<sup>16</sup>

Não está claro se nos pacientes com doença de Parkinson, a patologia intestinal se propaga para o cérebro e inicia os sintomas motores, e como fatores do lúmen, como a microbiota e dieta, poderiam influenciar o potencial de translocação intestino-cérebro, gravidade de sintomas intestinais, e perda de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo.

Uma coisa é certa, os pacientes com *PD* apresentam disbiose, a qual esta correlacionada com o fenótipo clínico, embora não se tenha determinado se as alterações observadas do microbiota contribuem para a patogénese da doença ou se são uma consequência da *PD*.<sup>16</sup>

Considerando que defeitos no *ENS* causam o desenvolvimento de doenças do *SNC*, compreender o mecanismo molecular das interações microbiota-*ENS* pode ajudar a obter novas estratégias terapêuticas para múltiplos tipos de doenças neuro degenerativas.

## Malária

A malária é uma doença potencialmente letal provocada por parasitas do género *Plasmodium*. Estes parasitas são tradicionalmente transmitidos às ao ser humano através de mosquitos fêmea do género *Anopheles* infetados com o parasita.

Uma equipa de cientistas espalhados pelo globo descobriu um anticorpo capaz de conferir proteção contra a infeção por *Plasmodium falciparum* em humanos, este anticorpo denominado por *anti- $\alpha$ -gal* encontra-se normalmente inibido pela expressão do gene  *$\beta$ -galactoside- $\alpha$ 1-3-galactosyltransferase ( $\alpha$ 1,3GT)* que possibilita a transcrição e tradução do polissacarídeo Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R ( *$\alpha$ -gal*). Devido a este polissacarídeo ser de origem endógena torna inviável a produção de anticorpos contra o mesmo em condições fisiológicas normais pois causaria uma reação de autoimunidade, portanto o que foi feito foi o silenciamento deste gene, que terminou a produção do  *$\alpha$ -gal* e permitiu a produção de anticorpos *anti- $\alpha$ -gal* como ocorre para tantos outros polissacarídeos de origem xenobiótica.<sup>21</sup>

Estes anticorpos atuam ao nível da pele exercendo um efeito citotóxico nos esporozoítos imediatamente após a inoculação por parte do mosquito. Pensa-se que como os humanos não expressam  *$\alpha$ -gal* e que até 1-5% da totalidade de imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG) circulantes em adultos saudáveis é dirigido contra este glicano, a produção de anticorpos *anti- $\alpha$ -gal* ocorre devido á presença de bactérias do microbiota que expressem o polissacarídeo  *$\alpha$ -gal*, como alguns membros específicos de *Klebsiella spp*, *Serratia spp* e *Escherichia spp* e que deve estar localizado na cápsula, nas glicoproteínas da parede celular e no *LPS* destas. Uma espécie denominada de *E.coli 086:B7* destaca-se das outras por ser aquela que induz níveis mais altos de anticorpos IgM *anti- $\alpha$ -gal*, níveis esses necessários para reduzir a transmissão de malária por parte do vetor visto que basta que alguns esporozoítos escapem a este mecanismo de defesa para estabelecerem infeção. Este mecanismo esclarece também porque que a incidência de malária é maior nas crianças do que nos adultos, pois as crianças abaixo dos 2-3 anos não possuem níveis significativos destes anticorpos.<sup>21</sup>

A origem do polissacarídeo no esporozoíto não é conhecida de momento, podendo este ser produzido pelo parasita ou pelo vetor, apesar disto foi detetado nas glândulas salivares de mosquitos não infetados níveis baixos de  *$\alpha$ -gal*, sendo possível que este se encontre em alguma proteína derivada do vector.<sup>21</sup>

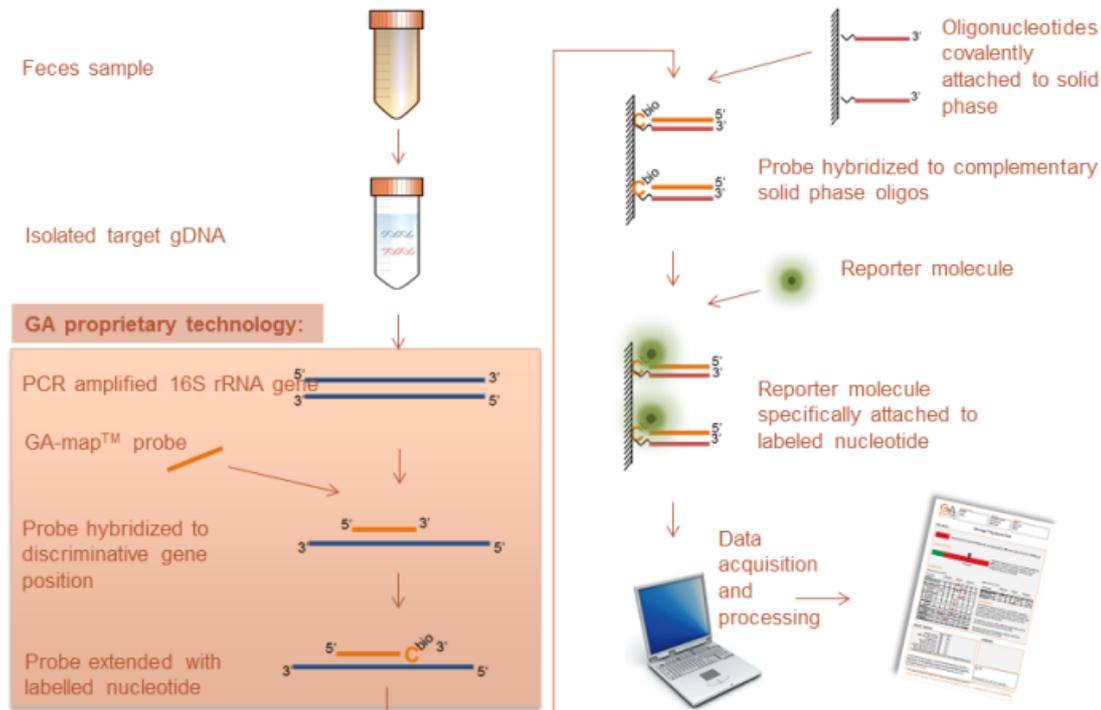
Esta descoberta quando associada a antigénios próprios do parasita irá aumentar a imunogenicidade destes e aumentar a eficácia de futuras vacinas baseadas nestes antigénios.

21

A disbiose está associada com muitas doenças, incluindo a síndrome do intestino irritável (IBS), doenças inflamatórias do intestino (IBD), obesidade e diabetes. Evidências recentes, sugerem ainda uma ligação entre autoimunidade e a composição intestinal em várias doenças reumáticas incluindo a esclerose sistémica (SSc).<sup>22</sup>

O potencial impacto clínico do desequilíbrio no microbiota intestinal sugere a necessidade de novos métodos de diagnósticos padronizados que facilitem o traçar do perfil do microbioma.

Recentemente, surgiu no mercado, um novo teste de diagnóstico usando amostras fecais para definir o perfil do microbiota intestinal e identificar e caracterizar a disbiose/normobiose (Figura 16 e 17).<sup>23</sup>



**Figura 16:** Procedimento do Teste de disbiose GA-map™.

Genetic Analysis AS desenvolveu uma plataforma que permite a identificação de diversos fragmentos de genes numa só reação. O método consiste na extração de ácido desoxirribonucleico duma amostra de fezes que depois é submetida a reações de PCR de modo a amplificar o gene 16S do rRNA bacteriano, depois diferentes sondas são utilizadas para identificar as diferentes espécies. Software específico foi desenvolvido para conseguir identificar as diferentes sondas e com isso chegar a conclusão de que espécies estavam presentes na amostra.



**Ordering Physician**

Physician:  
Clinic:

**Specimen**

Sample ID:  
Collection Date:  
Date Received:  
Report Date:

**Patient/ID**

Patient:  
Date of Birth:  
Gender:

SOP1-25-V1.0

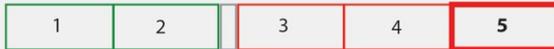
## GA-map™ Dysbiosis Test

**TEST RESULT:**

**POSITIVE**

The GA-map™ test result is **POSITIVE**.  
The microbiota pattern differs from what is found in a healthy gut.

**DYSBIOSIS INDICATOR:**



Dysbiosis

A Dysbiosis Index above 2 shows a microbiota profile that differs from a reference population based on an unselected group of non-symptomatic individuals (age 18-60) from Norway and Sweden.

**BACTERIA PROFILE:**

Selected genera and species

Probe target*	Reduced		Normal		Elevated		
	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
<b>Firmicutes</b>							
Ruminococcus albus / bromii <sup>1</sup>				●			
Ruminococcus gnavus <sup>2</sup>				●			
Faecalibacterium prausnitzii <sup>3</sup>			●				
Lactobacillus <sup>4</sup>						●	
Streptococcus sanguinis and S. salivarius thermophilus <sup>5</sup>				●			
Dialister invisus <sup>6</sup>				●			
<b>Verucromicrobia</b>							
Akkermansia muciniphila <sup>7</sup>							●
<b>Bacteroidetes</b>							
Bacteroides fragilis <sup>8</sup>					●		
Alistipes <sup>9</sup>				●			
<b>Proteobacteria</b>							
Shigella / Echerichia <sup>10</sup>						●	
<b>Actinobacteria</b>							
Bifidobacterium <sup>11</sup>							●

\*More information about the probe targets on the reverse page.

Higher taxonomic groups

Probe target*	Reduced		Normal		Elevated		
	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
<b>Bacteroides / Prevotella<sup>12</sup></b>				●			
<b>Firmicutes (Bacilli)<sup>13</sup></b>					●		
<b>Firmicutes (Clostridia)<sup>14</sup></b>				●			
<b>Proteobacteria<sup>15</sup></b>						●	

**TEST DESCRIPTION:**

The Dysbiosis Indicator is based on measurements of more than 300 bacterial strains. A selection of the most important bacteria are presented in the bacteria profile to the left and above.

The Dysbiosis Indicator will be affected by all 300+ bacteria strains.

**QUALITY CONTROL:**

Passed

**COMMENTS:**

None

GA-map™ Dysbiosis Test is CE marked in compliance with the IVDD 98/79/EC (in Vitro Medical Device Directive). GA-map™ Dysbiosis Test should not be used as a screening test. The GA-map™ Dysbiosis Test is not intended to diagnose disease or pre-disposition to disease. GA does not provide specific medical or lifestyle advice. Diagnosis and treatment decisions are the responsibility of the practitioner.

Sign Off

Laboratory Manager

The GA-service laboratory is compliant with requirements of ISO15189:2012

Genetic Analysis AS • Nycoveien 2, P.O. Box 4239 Nydalen, 0401 Oslo, Norway • Ph.: +47 48 32 16 10 • info@genet-analysis.com • www.genet-analysis.com

### Figura 17: Relatório do Teste de disbiose GA-map™.

O teste de disbiose GA-map™ pretende padronizar um perfil normal do microbiota (normobiose), um resultado abaixo de 2 indica um microbiota que difere de um grupo populacional de referência de idades compreendidas entre os 18 e os 70 anos.

Resumidamente, trata-se de uma plataforma tecnológica baseada no ácido desoxirribonucleico que permite a análise simultânea de um grande número de fragmentos genéticos similares (mas não idênticos) numa única reação. Isto permite identificar variações em centenas de bactérias diferentes (>300) existentes no intestino.

Este método utiliza sequências de ácido desoxirribonucleico comuns e variáveis dentro do gene 16SrRNA das bactérias para caracterizar e identificar as diferentes espécies.

Esta tecnologia torna possível, pela primeira vez, eficazmente e numa base de rotina analisar a composição do microbiota intestinal e correlacionar essa composição ou perfil com várias condições de saúde e doença. Embora a importância da microflora intestinal na saúde dos indivíduos esteja largamente reconhecida, até agora não existia nenhuma ferramenta de diagnóstico disponível.

## Considerações Finais

Como foi descrito ao longo deste documento a compressão das interações entre o nosso organismo e o microbiota constituem uma ferramenta essencial para compreendermos melhor a nossa fisiologia e podermos agir corretamente no caso de desequilíbrio da homeostase. O microbiota possibilita um correto desenvolvimento de sistemas essenciais para o ser humano, como o nervoso e o imunitário. É essencial durante esta fase que não hajam perturbações no microbiota, pelo que o uso de antibióticos no período neonatal deve ser o último recurso terapêutico disponível, pois uma perturbação nesta fase da vida pode vir a gerar problemas de autoimunidade no futuro e prejudicar o desenvolvimento do recém-nascido. Este conhecimento no futuro poderá revolucionar a terapêutica de diversas doenças intestinais como a doença de Crohn, síndrome do cólon irritável, intolerância a lactose, da depressão crônica, da doença de Parkinson, poderá ainda dificultar a transmissão de malária e dengue.

A regulação do microbiota através do uso de probióticos e prebióticos em conjunto com a epigenética constituem, portanto, as ferramentas terapêuticas que irão definir a medicina nos anos futuros, podendo vir a ser utilizadas para o tratamento de diversas patologias como as que foram referidas no parágrafo anterior.

Avaliar, por isso o microbiota como uma estratégia de diagnóstico pode permitir a monitorização de regime terapêuticos prescritos e a melhoria de novas aproximações terapêuticas.

# Bibliografía

1. ASH, C; MUELLER, K. (2016) - Manipulating the Microbiota. **Science (New York, N.Y.)**. **352**: 531.
2. ERNY, D; HRABE DE ANGELIS, A; PRINZ, M. (2017) - Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate. **Immunology**. **150**: 7-15.
3. GARCÍA-VELASCO, JA; MENABRITO, M; BRUNA CATALÁN, I. (2017) - What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. **Reproductive BioMedicine Online**. 2017).
4. CONG, X; WANLI, X; ROMISHER, R; POVEDA, S; FORTE, S; STARKWEATHER, A; HENDERSON, WA. (2016) - Focus: Microbiome: Gut Microbiome and Infant Health: Brain-Gut-Microbiota Axis and Host Genetic Factors. **The Yale Journal of Biology and Medicine**. **89**: 299.
5. DINAN, TG; STILLING, RM; STANTON, C. (2015) - Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior. **Journal of Psychiatric Research**. **63**: 1-9.
6. EGERT, M; SIMMERING, R; RIEDEL, CU. (2017) - The association of the skin microbiota with health, immunity and disease. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. **102**: 62-69.
7. KONG, H; SEGRE, J. (2017) - The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Investigating the Skin Microbiome. **Journal of Investigative Dermatology**. **137**: 79-82.
8. WOO, PCY; LAU, SKP; TENG, JLL; TSE, H; YUEN, KY. (2008) - Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**. **14**: 908-934.
9. TAKKEN, W; VERHULST, NO. (2017) - Chemical signaling in mosquito – host interactions : the role of human skin microbiota. **Current Opinion in Insect Science**. **20**: 68-74.
10. WITKIN, SS; LINHARES, IM. (2016) - Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota. **BJOG International Journal of Obstetrics and Gynaecology**. **124**: 606-611.
11. NEUMAN, H; KOREN, O (2017) - The Pregnancy Microbiome. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**. **88**: 1-9.
12. SÁNCHEZ, B; DELGADO, S; Míguez, AB; LOURENÇO, A; GUEIMONDE, M; MARGOLLES, A. (2017) - Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition and Food Research**. **61**: 1-15.

13. BLASER, MJ. (2016) - Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. **Science**. 352: 544-545.
14. PAMER, EG. (2016) - Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. **Science**. 352: 535-538.
15. MAYER, EA; TILLISCH, K; GUPTA, A. (2015) - Gut / brain axis and the microbiota. **The Journal of Clinical Investigation**. 125: 926-938.
16. OBATA, Y; PACHNIS, V. (2016) - The Effect of Microbiota and the Immune System on the Development and Organization of the Enteric Nervous System. **Gastroenterology**. 151: 836-844.
17. GENSOLLEN, T; IYER, SS; KASPER, DL; Blumberg, RS. (2016) - How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science (New York, N.Y.)**. 352: 539-44.
18. RIDAURA, V; BELKAID, Y. (2015) - Gut microbiota: The link to your second brain. **Cell**. 161: 193-194.
19. SHERWIN, E; REA, K; DINAN, TG; CRYAN, JF. (2016) - A gut (microbiome) feeling about the brain. **Curr Opin Gastroenterol**. 32: 96-102.
20. SMITH, SM.; VALE, WW. (2006) - The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**. 8: 383-395.
21. YILMAZ, B; PORTUGAL, S; TRAN, TM; GOZZELINO, R; RAMOS, S; GOMES, J; REGALADO, A; COWAN, PJ; d'APICE, AJF; CHONG, AS; DOUMBO, OK; TRAORE, B; CROMPTON, PD; SILVEIRA, H; SOARES, MP. (2014) - Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. **Cell**. 159: 1277-1289.
22. ANDRÉASSON, K; ALRAWI, Z; PERSSON, A; JÖNSSON, G; MARSAL, J - Intestinal dysbiosis is common in systemic sclerosis and associated with gastrointestinal and extraintestinal features of disease. **Arthritis Research & Therapy**. 18: 278.
23. CASÉN, C; VEBØ, HC; HEGGE, FT; KARLSSON, MK; CIEMNIEJEWSKA, E; DZANKOVIC, S; FRØYLAND, C; NESTESTOG, R; ENGSTRAND, L; MUNKHOLM, P; NIELSEN, OH; ROGLER, G; SIMRÉN, M; ÖHMAN, L; VATN, MH; RUDI, K. (2015) - Deviations in human gut microbiota: A novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. 42: 71-83.