



Cátia Teixeira Pinto

Homeostase da Microbiota Intestinal: Saúde ou Doença no Homem

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cátia Teixeira Pinto

Homeostase da Microbiota Intestinal: Saúde ou Doença no Homem

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Carvalho Cardoso e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A Tutora da Monografia

(Professora Doutora Olga Cardoso)

A Aluna

(Cátia Teixeira Pinto)

Eu, Cátia Teixeira Pinto, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011166403, declaro assumir a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia 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 informação ou expressão, por mim utilizada, estará referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 16 de setembro de 2016.

(Cátia Teixeira Pinto)

AGRADECIMENTOS

Nesta página quero deixar as minhas palavras de agradecimento a todos os que me acompanharam neste percurso e sobretudo aqueles que possibilitaram que eu aqui chegasse.

Em primeiro lugar, aos meus pais, que mesmo longe estão sempre perto e nunca deixaram de me acompanhar e de se orgulharem das minhas conquistas e apoiarem sempre. Por todo o mimo, carinho e ensinamentos que me transmitiram.

À minha irmã e à minha avó que estão sempre lá em todos os momentos e com quem posso sempre contar. A minha “Mãe Irene”, que tanto me ensinou e que tanto se orgulha deste meu percurso.

Ao Artur, que esteve comigo desde o início e sempre me incentivou a lutar e me apoiou em todas as minhas decisões. Pelo amor, paciência, compreensão e acima de tudo amizade, obrigada.

À minha família, por me terem ajudado a tornar quem sou e por festejarem comigo as minhas conquistas.

A todos os meus amigos, os que já me acompanhavam e todos aqueles que tive oportunidade de conhecer e com quem partilhei muitos dos momentos, nesta também nossa Coimbra, estão todos no meu coração.

A título especial, à Ana Isabel por ser a minha amiga de sempre e por nunca nada ter mudado, mesmo que tenhamos escolhido caminhos diferentes.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Olga Cardoso, pela disponibilidade, atenção e orientação para a elaboração desta monografia, bem como pelo gosto que me transmitiu para a Microbiologia durante as aulas.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, incluindo nela o corpo docente e não docente, por todo o conhecimento, oportunidades e experiências que me proporcionou ao longo destes 5 anos.

Um obrigado é pouco.

RESUMO

A microbiota intestinal do Homem é constituída por dezenas de biliões de microrganismos, contendo mais de 1000 espécies de bactérias conhecidas com mais de 3 milhões de genes, o que equivale a 150 vezes mais do que genes humanos.

A sua colonização começa desde o nascimento e sofre variações de acordo com diversos factores externos, como a dieta, e factores intrínsecos ao hospedeiro, como a sua fisiologia.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, a importância da microbiota tem vindo a ser conhecida, bem como a sua ligação com diversas patologias. Assim, a microbiota intestinal assume um papel importante no hospedeiro, tendo por exemplo influência no seu metabolismo e sistema imunitário.

Quando ocorre um desequilíbrio nas funções ou na constituição da microbiota, conhecido por disbiose, também o hospedeiro é afectado.

Vários estudos têm evidenciado o envolvimento da disbiose com patologias, quer intestinais, quer extra-intestinais. Essas doenças podem ser exemplificadas na doença inflamatória intestinal, que engloba a doença de Crohn e a colite ulcerosa; a síndrome metabólica; e doenças alérgicas como o eczema atópico.

Com estas evidências e com o avanço da ciência, novas estratégias terapêuticas podem ser desenvolvidas para o tratamento das patologias cujo envolvimento da microbiota parece estar presente, usando este envolvimento como alvo.

Palavras-Chave: Microbiota Intestinal, Bactérias Intestinais, Microbioma, Disbiose.

ABSTRACT

The human intestinal microbiota is composed of tens of billions of microorganisms containing more than 1000 known species of bacteria with more than 3 million genes, which amounts to 150 times more than human genes.

The colonization starts from birth and varies according to several factors such as diet and factors related to the host, as its physiology.

With the development of new technologies, the importance of the microbiota has been known as well as their connection to various diseases. Thus, the intestinal microbiota plays an important role in the host, for example having influence on the metabolism and immune system.

When there is an imbalance in the functions or the constitution of the microbiota, known as dysbiosis, also the host is affected.

Several studies have shown the involvement of dysbiosis with pathologies, either intestinal or extra-intestinal. These diseases can be exemplified in inflammatory bowel disease which includes Crohn's disease and ulcerative colitis, metabolic syndrome, allergic diseases such as atopic eczema.

With this evidence and with the advancement of science, new therapeutic strategies can be developed for the treatment of diseases whose involvement microbiota appears to be present, using this involvement as a target.

Key Words: Gut Microbiota, Intestinal Bacteria, Microbiome, Dysbiosis

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC - Ácidos Gordos de Cadeia Curta

CU - Colite Ulcerosa

DAA - Diarreia associada ao uso de antibióticos

DC - Doença de Crohn

DII - Doença Inflamatória Intestinal

ESNM - *European Society for Neurogastroenterology and Motility*

IgG - Imunoglobulina G

PAMPs - Padrões moleculares associados a agentes patogénicos

RNA - Ácido Ribonucleico

SCI - Síndrome Cólon Irritável

TGI - Tracto Gastrointestinal

TLRs - Receptores do tipo Toll

TMF - Transplante da microbiota fecal

ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
INTRODUÇÃO	8
Microbiota Intestinal	9
I. Constituição	9
II. Colonização	11
III. Factores condicionantes da composição	12
IV. Funções:	13
Metabolismo.....	13
Protecção do hospedeiro e desenvolvimento do sistema imunitário	13
Eixo cérebro-intestino	14
Disbiose e Patologias associadas	14
I. Ação dos antibióticos	15
II. Síndrome do Intestino Irritável (SII ou IBS)	17
III. Doença Inflamatória Intestinal (DII)	17
IV. Doenças do Sistema Metabólico	20
V. Eczema Atópico e Outras Doenças Alérgicas	21
VI. Infecção por <i>Clostridium difficile</i>	22
CONCLUSÃO	25
BIBLIOGRAFIA	26

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o nosso conhecimento sobre o corpo humano e a sua simbiose com os microrganismos mudou muito. Hoje em dia, o ser humano pode ser visto como um superorganismo: um conjunto complexo de células humanas e não humanas.

Triliões de bactérias colonizam o corpo humano, sendo que o maior aglomerado se encontra no Tracto Gastrointestinal (TGI), do qual faz parte a microbiota intestinal.

Muito do conhecimento actual sobre a microbiota intestinal e a sua ligação com a saúde humana resultam de inúmeros estudos, existindo desde 2012 uma plataforma na internet cujo objectivo é difundir e partilhar os conhecimentos, denominada “Gut Microbiota for Health” criada pela secção “Gut Microbiota and Health” da “European Society for Neurogastroenterology and Motility”(ESNM).

De facto, a existência de mais de 3 milhões de genes microbianos, amplia a capacidade do genoma humano quer na produção de vitaminas e aminoácidos, na metabolização de compostos normalmente indigeríveis, bem como na modulação do sistema imune e na resistência contra agentes patogénicos.

A microbiota intestinal revela-se fundamental para a saúde do Homem, assim a disbiose, ou seja, o desequilíbrio na composição ou na função desta, parece ter implicações em patologias como a doença inflamatória intestinal, síndrome metabólica e alergias.

A presente monografia tem então como objectivo, explorar um pouco mais desta relação entre a microbiota intestinal e o Homem e as suas consequências na saúde humana.

Microbiota Intestinal

A palavra microbiota representa um conjunto de microrganismos (bactérias, *archaea*, vírus e pequenos eucariotas) que reside num ambiente previamente estabelecido. O microbioma diz respeito ao genoma desses micróbios.

Os seres humanos têm aglomerados de microrganismos em diferentes partes do corpo, tais como na pele, boca, vagina e intestino. O TGI é o local de maior densidade populacional destes micróbios. Assim microbiota intestinal é o nome dado à população de microrganismos que habita no nosso intestino.

I. Constituição

A nossa microbiota intestinal contém dezenas de bilhões de microrganismos, incluindo, pelo menos 1000 espécies diferentes de bactérias conhecidas com mais de 3 milhões de genes (150 vezes mais do que os genes humanos). A microbiota pode, no total, pesar até 2 kg.

Um terço da nossa microbiota intestinal é comum à maioria das pessoas, enquanto dois terços são específicos para cada um de nós. Por outras palavras, a microbiota no intestino é como um cartão de identidade individual.

Nos adultos saudáveis, as bactérias que constituem a microbiota intestinal são essencialmente anaeróbios obrigatórios, que superam os anaeróbios facultativos e os aeróbios em 100 vezes, e que não sobrevivem mais do que alguns minutos na presença de oxigénio, sendo o seu cultivo difícil (1)(2).

Assim, a metagenómica assume uma grande relevância pois tem como princípio a análise de genomas de comunidades microbianas de um determinado habitat, por isolamento e sequenciação do DNA diretamente desse ambiente, sem necessidade de cultura. Esta técnica levou à criação de bibliotecas metagenómicas, que arquivam o material genético extraído e que permitem a pesquisa de novos genes.

O desenvolvimento de abordagens independentes de cultura, maioritariamente baseadas na análise do gene RNA ribossomal 16S, permitem um maior conhecimento da diversidade microbiana do TGI (2).

Para além da metagenómica, as abordagens funcionais, como a metatranscriptómica, metaproteómica e a metabolómica (meta-ómicas), também contribuem para esse conhecimento (2).

A metatranscriptómica reconhece quais são os genes que estão ou não a ser expressos

num ambiente e consegue monitorizar as alterações que ocorrem na sua transcrição. De facto, o metatranscriptoma intestinal humano parece ser mais sensível às alterações dietéticas de curto prazo do que o metagenoma. Estudos recentes demonstraram que uma mudança nutricional de 10 para 40 g de fibra por dia, modificou a expressão de genes da microbiota em adultos jovens e saudáveis. Genes relacionados com glicanos e com o metabolismo lipídico e vários transportadores glicosídeos foram significativamente sobre-representados, com a ingestão de 40 g de fibra por dia. Por outro lado, os genes envolvidos na degradação da mucina e genes que codificam chaperones moleculares e proteínas de choque térmico foram reprimidos quando a ingestão de fibra aumentou (2).

A metaproteómica possibilita uma caracterização melhorada do funcionamento de proteínas ou péptidos para uma maior compreensão da comunidade microbiana. Por fim, a metabolómica permite analisar os metabolitos que são produtos finais de processos químicos ou celulares e, assim, proporcionar uma explicação próxima da fisiologia do organismo.

Estas abordagens têm o potencial de salientar o complexo “*crosstalk*” entre os humanos e o seu ecossistema microbiano, bem como para salientar a influência sistémica destes últimos para lá do intestino (2). (Fig.1)

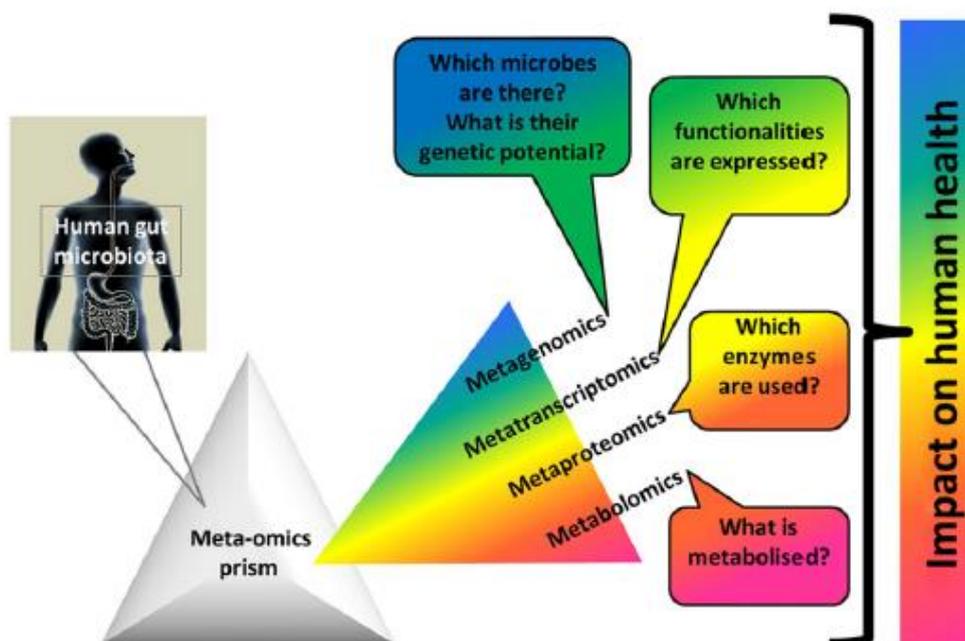


Figura 1 - Perspectiva das análises meta-ómicas sobre a microbiota intestinal.

[Adaptado de Mondot e Lepage, 2016].

Embora tenha sido detetada a presença de muitas filos no intestino até hoje, as filos dominantes são: a *Bacteroidetes* (anaeróbios gram-negativos, que incluem *Bacteroides*, *Parabacteroides* e *Prevotella*) e *Firmicutes* (organismos gram-positivos, como os *Bacilli* e *Clostridia*) (1)(3)(12).

Outras filos foram encontradas na parte distal do intestino humano, são elas *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, como se pode ver, na figura 2. Apenas algumas espécies de Archea estão representadas, principalmente *Methanobrevibacter smithii* (3).

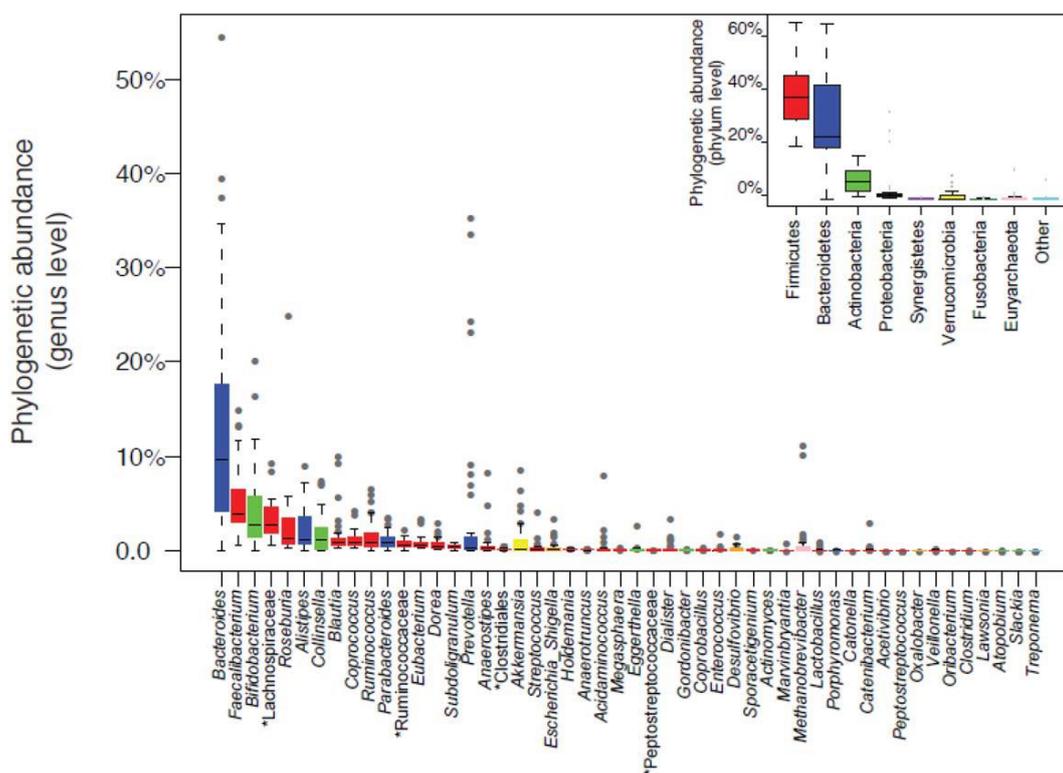


Figura 2 - Abundância filogenética na microbiota intestinal [Adaptado de Guarner, 2015].

II. Colonização

A colonização microbiana do intestino humano começa com o nascimento. O TGI do bebê é rapidamente colonizado durante e após o parto. O recém-nascido, quando atravessa o canal do parto, fica exposto à população microbiana da vagina da mãe. Assim, a microbiota intestinal do bebê, apresenta semelhanças com a microbiota vaginal da mãe. As bactérias identificadas incluem membros do género *Bifidumbacterium*, *Ruminococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* e *Enterobacter* (4).

O parto por cesariana, aparentemente, faz com que os bebés adquiram microrganismos provenientes da pele, dominados pela taxa *Propionibacterium* e *Staphylococcus* (4).

Os bebés que nasceram através de cesariana mostram um número reduzido de microrganismos no intestino, quando comparados com os bebés de parto normal. Estas diferenças deixam de ser significativas aos 6 meses de idade (1).

Durante o primeiro ano de vida, a composição da microbiota intestinal é relativamente simples e mostra amplas variações (1)(14).

O modo de alimentação também influencia a microbiota intestinal do bebé. O leite materno contém nutrientes, anticorpos maternos e também diversas bactérias comensais maternas, entre elas *Bifidobacteria* e *Lactobacilli* (4).

Quando comparados com bebés que não são alimentados com leite materno, os lactentes que o são apresentam baixos níveis de *Atopobium* e elevados níveis de *Bifidobacterium* (4)(14).

Por volta dos 3 anos de idade, a composição da comunidade microbiana assemelha-se mais com a do adulto e a maioria das variações estão associadas com uma série de acontecimentos, tais como a introdução de alimentos sólidos (4).

III. Factores condicionantes da composição

A composição microbiana no tracto gastrointestinal é influenciada por inúmeros factores relacionados com o hospedeiro e externos. Relativamente a estes últimos, incluem a carga microbiana do ambiente circundante, os alimentos e hábitos alimentares, e a composição da microbiota materna. Além disso, o *stress* e a temperatura podem influenciar a variação de micróbios. Também os xenobióticos, nomeadamente as terapêuticas medicamentosas, como a antibioterapia têm um papel importante na composição da microbiota (1)(4).

A antibioterapia tem revelado um papel importante sobre a constituição da microbiota. Três pontos importantes podem ser estabelecidos. Em primeiro lugar, os agentes antimicrobianos podem ter efeitos específicos sobre os componentes individuais da microbiota, em vez de uma supressão geral não específica de todos os micróbios. Em segundo lugar, o perfil microbiológico resultante pode influenciar a população que emerge após o tratamento ser interrompido. Em terceiro lugar, os efeitos da terapia com antibióticos podem persistir (4).

Porque os antibióticos têm modos de acção específicos e os organismos apresentam diferentes sensibilidades, não é de estranhar que os antibióticos específicos influenciem grupos individuais (4).

O factor externo mais estudado tem sido a dieta (4)(14).

Os factores intrínsecos, ou relacionados com o hospedeiro, incluem as contribuições da fisiologia do hospedeiro, como o pH intestinal, nutrientes endógenos e as interações microbianas. Também o peristaltismo, os ácidos biliares, as secreções do hospedeiro, bem como a resposta imune e os receptores bacterianos da mucosa influenciam a homeostase da microbiota. De salientar que a comunidade microbiana intestinal muda com a idade (1)(4)(14).

IV. Funções:

Metabolismo

As bactérias do intestino são capazes de produzir uma variedade de vitaminas, sintetizar todos os aminoácidos essenciais e não essenciais e realizar a biotransformação da bÍlis. Além disso, o microbioma fornece as vias bioquímicas vitais para o metabolismo de hidratos de carbono não digerÍveis, que incluem grandes polissacÁridos, tais como amido resistente, celulose, hemicelulose, pectinas e gomas; alguns oligossacÁridos que escapam à digestão; açúcares e álcoois não absorvidos a partir da dieta (1).

Esta funcionalidade resulta na recuperação de energia e substratos absorvÍveis para o hospedeiro e num fornecimento de energia e nutrientes para o crescimento e proliferação bacteriana. O metabolismo dos hidratos de carbono é a maior fonte de energia no cólon (1)(5).

Os microrganismos libertam ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) a partir de fibras da dieta, estes são uma importante fonte de energia para a mucosa intestinal e críticos na modulação de respostas imunes e tumorigenese no intestino (5).

Protecção do hospedeiro e desenvolvimento do sistema imunitário

Muitas bactérias intestinais são capazes de produzir compostos antimicrobianos, conhecidos como bacteriocinas, e competir por nutrientes. Tendo as bactérias intestinais vantagem em termos de número, e locais de fixação no revestimento do intestino, impedindo assim a colonização por agentes patogénicos e a sua possível fixação e consequente entrada no organismo das bactérias enteroinvasoras. Esta acção é conhecida como o efeito de barreira ou de exclusão competitiva (Lei de Gause) (1).

O epitélio intestinal é a interface principal entre o sistema imunitário e o meio ambiente externo. O desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro é afectado pela interacção contínua e dinâmica com a microbiota intestinal e os seus metabolitos (1).

As bactérias são essenciais para o desenvolvimento inicial do sistema imunitário da mucosa intestinal, tanto em termos dos seus componentes físicos como da sua função, e continuam a desempenhar um papel importante na sua acção (1)(15).

As células do epitélio intestinal evitam ameaças de agentes patogénicos através de sinalização para o sistema imune inato, por receptores específicos que reconhecem e se ligam a moléculas específicas associadas a bactérias, levando à produção da resposta imune do hospedeiro e à libertação de péptidos protectores, citocinas, e glóbulos brancos. O resultado pode ser uma resposta protectora para bactérias comensais, uma resposta inflamatória para os organismos patogénicos, ou o desencadear da morte celular do hospedeiro (1)(15).

A exposição a bactérias intestinais também está implicada na prevenção de alergia. Lactentes e crianças jovens alérgicas apresentam uma composição diferente de bactérias intestinais daqueles que não desenvolvem alergias. Se a hipótese de que o microbiota intestinal estimula o sistema imunológico e treina-o para responder proporcionalmente a todos os antígenos, a composição alterada da microbiota intestinal no início da vida pode levar a um sistema imunológico inadequadamente treinado que pode, e muitas vezes, reage de forma exagerada aos antígenos (1).

Eixo cérebro-intestino

Este é um sistema de comunicação que integra sinalização neuronal, hormonal e imunológica entre o intestino e o cérebro, que oferece a microbiota intestinal e os seus metabolitos como uma via potencial através do qual se pode aceder ao cérebro. Este sistema de comunicação é bidireccional, o que permite que o cérebro possa comandar as funções gastrointestinais, tais como peristalse, a produção de mucina e funções imunológicas (1)(10).

Um avanço significativo foi feito durante a última década no reconhecimento das formas importantes com que a microbiota intestinal se relaciona com a função cerebral (1).

Foster e McVey Neufeld fizeram a revisão das principais conclusões, mostrando que o *stress* influencia a composição da microbiota intestinal e que a comunicação bidireccional entre a microbiota intestinal e o sistema nervoso central influencia a reactividade ao *stress* do hospedeiro. Foi demonstrado que o *stress* influencia a integridade do epitélio intestinal e pode alterar o peristaltismo, secreções e a produção de mucina, alterando assim o habitat da microbiota intestinal e promovendo as mudanças na composição e/ou do metabolismo microbiano (1).

Disbiose e Patologias associadas

A disbiose pode ser definida como o desequilíbrio na diversidade ou função de uma comunidade microbiana (6).

A alteração na microbiota pode resultar da exposição a diversos factores ambientais, como a dieta, toxinas, medicamentos e agentes patogénicos. Dentre estes, os últimos são os que têm maior potencial (3).

A riqueza do ecossistema microbiano intestinal parece ser uma característica crítica para uma microbiota intestinal saudável (3).

O termo disbiose é inútil se utilizado apenas para descrever uma mudança na microbiota, a qual é assumida como sendo prejudicial para o hospedeiro. Em alguns casos, a microbiota

pode alterar-se numa resposta adequada a uma mudança no hospedeiro, ou pode representar um fenómeno sem implicações fisiopatológicas (7).

Portanto, como toda a complexidade funcional da microbiota intestinal não fica completamente definida com apenas uma determinação da composição por cesso taxonómica, uma análise funcional pode fornecer informações sobre as funções metabólicas e imunológicas, assim como interações microbiota – hospedeiro (7).

Tem existido evidência crescente de que o desequilíbrio da microbiota intestinal está associada com a patogénese quer de doenças intestinais quer de doenças extra-intestinais. As desordens intestinais incluem a doença inflamatória intestinal (DII), síndrome do cólon irritável (SCI) e a doença celíaca. Por sua vez os transtornos extra-intestinais incluem alergia, asma, síndrome metabólica, doença cardiovascular e obesidade (6).

Uma baixa diversidade está associada a um desequilíbrio entre as espécies pró e anti-inflamatórias e podem provocar inflamação do hospedeiro (3).

A contagem de genes microbianos pode ser utilizada como um biomarcador preciso da diversidade microbiana. Com esta estratégia pode-se avaliar a presença e abundância de genes a partir de uma taxa conhecida ou desconhecida, incluindo não só as bactérias, mas também vírus e eucariotas. Curiosamente, os indivíduos com contagens baixas (abaixo dos 480,000 genes microbianos) são caracterizados pela adiposidade global mais acentuada, a resistência à insulina, resistência à leptina, dislipidemia, e um fenótipo inflamatório mais pronunciado, quando comparado com os indivíduos de elevadas contagens de genes. Além disso, vários parâmetros metabólicos apresentam-se um pouco alterados em indivíduos saudáveis com baixas contagens de genes microbianos. Os indivíduos obesos com baixa contagem de genes ganharam mais peso ao longo do tempo e tinham uma propensão para comorbilidades metabólicas. Assim, baixa diversidade parece ser um factor de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólico (diabetes de tipo 2, dislipidemia, esteato-hepatite)(3).

De um ponto de vista funcional, a baixa diversidade está associada com uma redução das bactérias produtoras de butirato, aumento do potencial de degradação de muco, e redução da produção de hidrogénio e metano combinadas com o aumento da formação de sulfureto de hidrogénio. A microbiota pobre em genes parece, portanto, ser menos saudável (3).

I. Ação dos antibióticos

O ser humano e, conseqüentemente, a sua microbiota intestinal estão muitas vezes expostos a antibióticos, devido, não só à utilização destes para fins médicos, mas também devido à sua utilização na criação de animais para consumo humano (8).

A composição do microbioma pode ser rapidamente alterada por exposição a antibióticos, com potenciais efeitos imediatos na saúde, por exemplo através da seleção de agentes patogénicos oportunistas resistentes que podem causar doença aguda. As alterações induzidas pelos antibióticos podem também afectar indirectamente a saúde a longo prazo (1)(8).

Antibióticos de largo espectro podem afetar a abundância em 30% das bactérias na comunidade intestinal, causando quedas rápidas e significativas na riqueza, diversidade e uniformidade taxonómica (8).

Uma vez parado o tratamento com antibiótico, a microbiota pode apresentar um certo grau de resiliência, sendo capaz de voltar a uma composição similar à original, mas o estado inicial nem sempre é recuperado. De facto, as alterações induzidas pelos antibióticos podem permanecer após longos períodos de tempo, abrangendo meses e mesmo anos (8).

A exposição prematura aos antibióticos, tanto reduz a diversidade da microbiota dos lactentes, como altera a sua composição, com uma atenuação de *Bifidobacterium* e aumento acentuado de *Proteobacteria*. Além disso, a microbiota dos recém-nascidos que não foram tratados, mas cujas mães receberam antibióticos antes do parto, mostraram as mesmas alterações observadas na microbiota das crianças tratadas (8).

As alterações da microbiota causadas por antibióticos, além de aumentarem o risco imediato para a infecção, também podem afectar a homeostase imunológica básica e causar repercussões de longo prazo. As doenças atópicas, auto-imunes e inflamatórias têm sido associadas à disbiose, e, em alguns casos, associações significativas foram estabelecidas entre estas doenças e a ingestão de antibióticos no início da vida. Na verdade, o efeito da disbiose induzida pelos antibióticos será ainda mais relevante se eles aparecerem no início da vida, um período crítico para a maturação do sistema imune e o estabelecimento da tolerância imunológica (8).

Além dos seus efeitos ecológicos diretos sobre a composição da microbiota intestinal, os antibióticos afectam a maneira pela qual esta comunidade interage com o hospedeiro e regula os seus processos fisiológicos básicos (8).

No que diz respeito à capacidade do sistema imunológico para combater infecções, os antibióticos, de forma indirecta, alteram a eficácia quer das respostas imunitárias inatas quer das adaptativas. Com as mudanças na composição da microbiota, não só os organismos não resistentes capazes de competir com potenciais agentes patogénicos perdem-se, mas também a comunidade alterada irá apresentar um repertório substancialmente diferente de padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs) para os receptores localizados nas células

imunes e epiteliais. Os PAMPs são moléculas localizadas à superfície dos microrganismos, tais como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos, capazes de activar a resposta imune inata. Isto vai resultar numa estimulação dos receptores alterados, tais como receptores *Toll - like* (TLRs), conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões da microbiota comensal, estando presentes em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, que podem desencadear cascata para baixo através de uma variedade de processos imunitários, incluindo o desenvolvimento do tecido linfóide, a diferenciação das células T, produção de antibacterianos e liberação de citocinas (8).

A disbiose provocada por antibióticos suporta a desvantagem adicional de enriquecer a microbiota com os organismos resistentes. A microbiota intestinal humana foi estabelecida como um significativo reservatório de resistências a antibióticos (8).

II. Síndrome do Intestino Irritável (SII)

A SII é definida como um grupo de desordens funcionais do intestino em que existe dor abdominal ou desconforto associado com a defecação ou com uma mudança nos hábitos intestinais e com características de defecação desordenada. Pensa-se que a SII afecte cerca de 10% a 20% de adultos e adolescentes em todo o mundo (1).

A causa exacta da SII é desconhecida e pensa-se ser multifactorial. Factores genéticos, disfunção motora do TGI, hipersensibilidade visceral, infecção, inflamação e imunidade, bem como os factores psicopatológicos, parecem desempenhar papéis no seu desenvolvimento. Juntamente com esses factores, a variação na microbiota intestinal parece ser cúmplice na inflamação intestinal de baixo grau associada com a síndrome. Além disso, a disbiose no intestino pode facilitar a adesão de agentes patogénicos entéricos que pode ser associada com sintomas da SII (1)(6).

A alteração na composição da microbiota normal e a perturbação da fermentação da colónia em pacientes com SII podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento de sintomas da SII, com um significativo aumento de 2 vezes na razão de *Firmicutes* para *Bacteroidetes* relatados em pacientes com SII (1).

III. Doença Inflamatória Intestinal (DII)

A DII abrange a doença de Crohn (DC) e colite ulcerosa (CU), cada uma com um desenvolvimento e tratamento diferente.

A Doença de Crohn é caracterizada por um padrão de inflamação semelhante a um paralelepípedo (isto é, regiões afectadas interrompidas por tecido saudável), o que pode

ocorrer em qualquer lugar ao longo do comprimento do TGI. Também é tipificado por ulcerações que podem cobrir a totalidade da parede intestinal, resultando em fissuras que podem perfurar a parede do intestino e ter impacto noutros órgãos tais como do rim ou do útero (1).

A Colite Ulcerosa manifesta-se tipicamente como uma inflamação crónica envolvendo apenas as camadas superficiais da parede intestinal. Ela está localizada sobretudo no cólon e geralmente origina-se no recto (1).

Há cada vez mais provas da implicação patogénica da microbiota do hospedeiro na doença inflamatória intestinal, como são as várias mudanças taxonómicas e funcionais, assim como os desequilíbrios na interacção hospedeiro-microbiota (9).

Este desequilíbrio do “*cross-talk*” pode ser entendido como uma relação bidireccional entre a função imune alterada (Barreira mucosa, a morte bacteriana inata ou regulação imune) e a alteração da comunidade bacteriana (características, funções ou metabolitos). A resposta imune desregulada contra bactérias intestinais comensais, em que os mecanismos de tolerância local no sentido dos micróbios comensais parecem ser prejudicados, pode contribuir para o aparecimento ou perpetuação da DII (9).

O papel da microbiota intestinal na patogénese da DII tem sido demonstrado por estudos que mostram que o uso de antibióticos pode reduzir ou prevenir a inflamação, tanto em modelos que utilizam murganhos com a doença como em pacientes. Além disso, os resultados de estudos com pacientes da CU inoculados com fezes coletadas de doadores saudáveis, indicaram remissão da doença no prazo de 1 semana após receber a sua transferência fecal, com recuperação completa observada após 4 meses (1).

À semelhança da SII, a disbiose da DII está relacionada em larga escala com alterações na abundância e diversidade da população *Firmicutes*, a sua abundância relativa observou-se ser bastante mais reduzida em pacientes com DII. A redução do número de *Firmicutes* é de particular interesse, pois são produtores de importantes ácidos gordos de cadeia curta, tais como acetato e butirato, que são conhecidos por terem propriedades anti-inflamatórias potentes (1).

Estudos da microbiota fecal e intestinal associada à mucosa demonstraram alterações quantitativas e qualitativas na composição e função associadas com DII, com uma mudança no sentido de um microbioma pró-inflamatório (9).

Na presença de microrganismos comensais, os pacientes com doença inflamatória do intestino mostram um aumento na actividade de anticorpos IgG e células T na mucosa, o que sugere a supressão dos mecanismos de tolerância local. Na verdade, existem vários fatores

que influenciam a estimulação e remissão de atividade inflamatória, como derivação do fluxo fecal, e o uso de antibióticos para tratar a doença de Crohn e de antibióticos de largo espectro no lúmen intestinal para tratar a colite ulcerosa (9).

Considerando-se que a doença de Crohn em humanos ocorre no cólon e íleo terminal, em que a concentração de bactérias é mais elevada, é justo assumir que a intolerância gerada pela microbiota combinada com a predisposição genética iria contribuir para o desenvolvimento desta condição inflamatória (10).

A lâmina própria intestinal é o local onde as células imunes reconhecem primeiro os antígenos bacterianos, antes da sua migração para o tecido linfóide distante para montar a resposta inflamatória. Os receptores do tipo Toll em células epiteliais e os receptores NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain - 2*) desempenham um papel importante na indução da resposta imunitária. Uma vez activados, estes receptores podem desencadear uma cascata intracelular que conduz à produção de citocinas pró-inflamatórias. Este mecanismo promove a maturação de células dendríticas da mucosa, que migram para estruturas linfóides locais, tais como placas de Peyer e nódulos linfáticos mesentéricos seguindo-se o reconhecimento do antígeno para iniciar ou manter respostas imunitárias das células T e B (10).

As células dendríticas iniciam a resposta imunitária, controlam a inflamação intestinal e mantêm a tolerância imunológica. Neste contexto, acredita-se que as células dendríticas das mucosas desempenham um papel chave na modulação da resposta imune contra o ambiente antigénico gastrointestinal, mantendo a homeostase intestinal e permitindo a convivência com a microbiota endógena (10).

Em indivíduos normais, a microbiota comensal não pode atravessar a barreira epitelial, e quando algumas destas bactérias conseguem passar através da barreira intestinal, são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos na mucosa, impedindo a activação da resposta imune intestinal. Por outro lado, quando os microorganismos patogénicos atravessam a barreira, a resposta imunitária é activada (10).

Quer na colite ulcerativa, quer na doença de Crohn existe uma diminuição da complexidade da microbiota, com uma perda de bactérias normais anaeróbias, uma composição temporária instável durante a remissão clínica, e uma disbiose relativamente a microrganismos seleccionados, com sobre- e sub-representação de algumas espécies (9).

Uma abundância excessiva de espécies *Desulfovibrio* tem sido descrita na colite ulcerosa, que têm potencial patogénico, devido à sua capacidade para gerar sulfuretos. Além disso, um aumento nos genes microbianos envolvidos no metabolismo da cisteína (aminoácido contendo enxofre) e dos sistemas de transporte de sulfato têm sido relatados (9).

A evidência clínica e básica sugere que a disbiose tem um papel-chave na iniciação e progressão da inflamação crônica no intestino. Um aumento notável na *Proteobacteria* (*E. coli* e outras enterobactérias), com uma diminuição acentuada em *Bacteroidetes* e *F. prausnitzii*, tem sido descritos. A proporção de bactérias patogênicas pode ascender a 30-40% das bactérias predominantes, embora seja bem conhecido que a causalidade não tem sido adequadamente estabelecida (7)(12).

A CU e doença de Crohn apresentam uma baixa abundância de *F. prausnitzii*, que tem conhecidas propriedades anti-inflamatórias, e isto está associado com um maior risco de recorrência pós-operatória da doença ileal, e com um concomitante aumento na abundância de *E. coli*. Estirpes de *E. coli* aderente-invasiva são especificamente associadas com o fenótipo ileal da DC (7).

IV. Doenças do Sistema Metabólico

As doenças metabólicas sistêmicas incluem obesidade e diabetes tipo 2. As primeiras indicações de que a microbiota intestinal está envolvida na obesidade vieram quando os ratos metabolicamente obesos, com uma mutação no gene da leptina, mostraram ter uma microbiota bastante diferente, em comparação com os ratos sem a mutação (1).

Outras investigações indicaram que a razão entre a *Bacteroidetes* e a *Firmicutes* na microbiota intestinal de murganhos obesos foi deslocada a favor de *Firmicutes*, enquanto que os murganhos magros foram dominados por *Bacteroidetes*. Em estudos com seres humanos mais recentes, os investigadores descobriram que a composição da microbiota intestinal foi alterada nos obesos, quando comparado com os indivíduos de peso normal e que a composição altera em resposta a variações no peso corporal do hospedeiro. Estudos subsequentes falharam, no entanto, para demonstrar uma relação consistente entre a obesidade e a proporção de *Firmicutes* para *Bacteroidetes*, tanto do filo como dos níveis de espécies (1)(12).

A Diabetes *Mellitus* Tipo 2 é um distúrbio complexo influenciado por elementos genéticos e ambientais, que se tornou um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Recentemente, estudos indicam que os riscos relacionados com o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 podem também envolver a composição da microbiota intestinal. A microbiota intestinal dos participantes com diabetes tipo 2 apresenta apenas um desvio limitado do grupo de controlo, embora haja um declínio nas bactérias produtoras de butirato, que pode ser metabolicamente benéfico (1).

O aumento na presença de várias categorias de bactérias patogênicas oportunistas

também foi detectado, embora a abundância destas categorias de agentes patogénicos oportunistas parece ser bastante variável (1).

A microbiota intestinal está implicada na aquisição de nutrientes, energia e produção de metabolitos, como os ácidos gordos de cadeia curta, que podem regular os processos metabólicos do hospedeiro. Os AGCC têm sido implicados em doenças metabólicas, incluindo obesidade e diabetes tipo 2. Níveis mais elevados de AGCC fecais, principalmente butirato e propionato, têm sido relatados em adultos obesos e crianças, quando comparados com indivíduos magros. Alterações isoladas na concentração e proporção de AGCC podem estar em linha com as mudanças na filo bacteriana presente (1)(12).

A riqueza de evidências agora existentes indica laços estreitos entre os sistemas metabólico e imunológico, e a microbiota intestinal está a ser cada vez mais reconhecida como um fator importante de conexão entre genes, ambiente e sistema imunológico (6).

Entre as muitas razões para manter um peso saudável está o paradigma emergente de que o desequilíbrio metabólico conduz ao desequilíbrio imunológico, com fome e imunossupressão numa extremidade do espectro e a obesidade e doenças inflamatórias na outra extremidade. É possível que qualquer disbiose que resulte numa desordenada alteração na composição e funcionalidade dos micróbios intestinais possa ter um papel no aumento da susceptibilidade a um estado de doença (1)(12).

V. Eczema Atópico e Outras Doenças Alérgicas

As doenças alérgicas, sobretudo aquelas causadas por hipersensibilização tipo I - eczema atópico, asma atópica, rinite - e alergias alimentares tipo I aumentaram globalmente a incidência ao longo dos últimos 50 anos. Actualmente, nos países desenvolvidos encontra-se uma incidência na população de 20%, constituindo uma proporção considerável da carga global de doenças (1).

A sensibilização atópica ocorre essencialmente nos primeiros 2 anos de vida e pode persistir durante toda a vida, com a expressão da doença alérgica começando com eczema (0-2 anos), asma (> 5 anos) e rinite (> 8 anos), sendo referida como a marcha atópica (1).

As causas do eczema atópico são muito numerosas e não são bem compreendidas, embora a forma de nascimento, isto é, vaginal ou cesariana, e uma mutação num determinado gene humano envolvido na função barreira da pele são conhecidos por estarem implicados (1).

A caracterização da microbiota intestinal de pessoas que sofrem de eczema atópico mostrou que bebés de 1 mês de idade com a doença tinham uma diversidade bacteriana

significativamente menor, especialmente no que diz respeito ao filo *Bacteroidetes*, em comparação com as crianças sem eczema atópico. O estudo também destacou a diminuição da diversidade de *Bacteroidetes* aos 12 meses de idade no grupo do eczema atópico, sugerindo que os doentes mantêm um baixo nível de diversidade bacteriana quando comparados com controlos saudáveis. Além disso, um número inferior de *Proteobacteria*, cujas paredes das células contêm moléculas de lipopolissacáridos, foi observado em lactentes com eczema atópico. Os lipopolissacáridos têm a capacidade de induzir uma resposta imune do hospedeiro, e a baixa exposição a lipopolissacáridos na infância está relacionada com um maior risco de eczema atópico (1).

Como uma explicação para o aumento marcado da doença alérgica, o conceito de reduzida exposição quantitativa e qualitativa ao mundo microbiano durante o período neonatal foi denominado a “hipótese de higiene” e baseia-se na observação do aumento da atopia em famílias mais pequenas, urbanas, de reduzida exposição ao desafio microbiano. Esta sub-exposição a antígenos microbianos conduz a um resultado anormal ao alérgico e ao processamento da resposta imunológica em vez de tolerância imunológica (1).

VI. Infecção por *Clostridium difficile*

No tracto gastrointestinal, o estado de disbiose causado por antibióticos leva os doentes susceptíveis à infecção por agentes patogénicos bacterianos oportunistas, que conduz a um espectro de doenças diarreicas infecciosas conhecidas como diarreia associada a antibióticos (DAA)(13).

Os agentes patogénicos associados com DAA incluem *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella oxytoca*. No entanto, em muitos casos, na DAA nenhum agente infeccioso pode ser determinado (13).

Embora o uso de antibióticos seja o principal factor de risco para a DAA infecciosa dos antibióticos específicos que resultam em doença, os sintomas diferem dependendo do organismo causador. Um factor de complicação da DAA é que o tratamento envolve, quase sempre, a administração adicional de antibióticos, o que impede a restauração da microbiota intestinal protectora, prolongando assim a doença ou facilitando a recaída (11)(13).

Em adição aos antibióticos, o uso de outros medicamentos, tais como inibidores da bomba de prótons está associado a uma predisposição para o DAA. Esta predisposição pode ser um resultado da acidez gástrica reduzida, permitindo que as bactérias sobrevivam ao trânsito no estômago, ou resultando na função imune celular reduzida, permitindo a sobrevivência do agente patogénico (8).

No geral, as taxas de DAA em populações pediátrica e adulta são semelhantes. No

entanto, no caso de *C. difficile*, que é o agente etiológico mais comum de DAA infecciosa, a idade é um importante factor de risco para o desenvolvimento da infecção, com a incidência de doença e gravidade crescente com o aumento da idade (11)(13).

De outros factores de risco da DAA referem-se sobretudo a uma redução no estado de saúde dos pacientes antes do início da doença com muitos destes factores de risco, sendo mais comum em pessoas idosas (13).

A infecção por *C. difficile* é primariamente uma doença adquirida no hospital identificada em pacientes idosos e imunocomprometidos, no entanto, infecção associada à comunidade emergiu na última década, e em pessoas que se pensavam ser de baixo risco, como crianças e mulheres grávidas (13).

A mudança da epidemiologia desta doença, juntamente com o aparecimento de estirpes que causam infecções mais graves, levou o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) a definir *C. difficile* como uma ameaça urgente (13).

O único processo de doença em que a microbiota disbiótica desempenha um papel, sem dúvida comprovada, é no caso da infecção por *Clostridium difficile*. O tratamento com antibióticos de forma transitória altera a composição da microbiota, fornecendo o nicho no qual este agente patogénico pode expandir (1).

O *C. difficile* é, um agente patogénico anaeróbio Gram-positivo formador de esporos que é responsável por 10% -25% dos casos de DAA. O espectro da doença causada por *C. difficile* comumente varia de portadores assintomáticos ou portadores com diarreia leve a moderada com cólicas abdominais até doentes com diarreia profusa e dor abdominal grave. Menos frequente, as condições mais graves, como a colite pseudomembranosa, megacólon tóxico ou perfuração do cólon podem ocorrer, às vezes levando à morte (13).

Os antibióticos mais associados a esta infecção incluem a clindamicina, a família das cefalosporinas, penicilinas de largo espectro e fluoroquinolonas (13).

O *C. difficile* é transmitido pela via fecal-oral através da ingestão do esporo bacteriano. Ao atingir o local do intestino anaeróbio de pacientes susceptíveis, os esporos germinam para células vegetativas metabolicamente activas que produzem toxinas activas e induzem doença no cólon (13).

A restauração da microbiota saudável normal por transplante de microbiota fecal (TMF) é uma terapia eficaz para o tratamento da infecção por *C. difficile*. O TMF consiste no enxerto de microbiota a partir de um dador saudável para um receptor, o que resulta na restauração da estrutura normal da comunidade microbiana do intestino, com o objectivo de recuperar o equilíbrio metabólico e imunológico. TMF introduz uma comunidade completa, estável e

Homeostase da microbiota intestinal: Saúde ou Doença no Homem

duradoura de microbiota intestinal, ao contrário dos probióticos, que alteraram temporariamente a actividade metabólica, ou imunológica da flora intestinal nativa. O mecanismo que facilita esta normalização microbiota, bem como a ocorrência de hipotéticos efeitos secundários a longo prazo, ainda tem de ser determinado. No entanto, TMF representa uma terapia emergente de estados de doença relacionados com disbiose, e é actual, o tratamento recomendado para reincidentes (7).

CONCLUSÃO

O desenvolvimento da biotecnologia permitiu investigar, de forma mais detalhada, a diversidade da microbiota intestinal bem como a sua relação de simbiose com o ser humano.

A microbiota intestinal humana desenvolve-se logo após o nascimento, podendo ser afectada por vários factores como a dieta, idade, consumo de antibióticos.

Já se percebeu que a homeostase da microbiota é fundamental para o bem-estar do seu hospedeiro, pois esta desempenha funções vitais quer no metabolismo, quer desenvolvimento do sistema imunitário e neurológico.

Assim, o distúrbio da diversidade ou composição da microbiota, conhecido como disbiose, pode levar ao comprometimento da homeostasia do Homem, podendo mesmo conduzir a situações de patologia.

De facto, a disbiose tem sido associada a patologias quer intestinais como a doença inflamatória intestinal, quer a patologias extra-intestinais como é o caso da síndrome metabólica e da infecção por *Clostridium difficile*.

Estas associações podem revolucionar o futuro dos estudos que procuram alternativas de tratamentos para muitas destas doenças.

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

BIBLIOGRAFIA

1. BULL, M.; PLUMMER, N. - Part I: **The Human Gut Microbiome in Health and Disease**. Integrative Medicine. 13(6). (2014) 17–22.
2. MONDOT, S.; LEPAGE, P. - **The Human Gut Microbiome and Its Dysfunctions Through the Meta-omics Prism**. Annals of The New York Academy of Sciences. (2016) I–II.
3. GUARNER, F. - **The Gut Microbiome: What do we know?** Clinical Liver Disease. Vol 5, N° 4 (2015). 86–90.
4. XU, Z.; KNIGHT, R. - **Dietary Effects on Human Gut Microbiome Diversity**. British Journal of Nutrition. 113 (1–5). (2015).
5. SHREINER, A.; KAO, J.; YOUNG, V. - **The Gut Microbiome in Health and in Disease**. National Institutes of Health. 31(1). (2016) 69–75.
6. TAGUER, M.; MAURICE, C. - **The Complex Interplay of Diet, Xenobiotics, and Microbial Metabolism in The Gut: Implications for Clinical Outcomes**. Clinical Pharmacology Therapy. 99(6). (2016).
7. TOJO, R.; SUÁREZ, A.; CLEMENTE, M.; REYES-GAVILÁN, C.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M.; RUAS-MADIEDO, P. - **Intestinal Microbiota in Health and Disease: Role of Bifidobacteria in Gut Homeostasis**. World Journal Gastroenterology. 20(41):151. (2014) 63–76.
8. FRANCINO, M. - **Antibiotics and The Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances**. Frontiers in Microbiology. 6(JAN). (2016) I–II.
9. DALAL, S.; CHANG, E. - **The Microbial Basis of Inflammatory Bowel Diseases**. The Journal of Clinical Investigation. 124(10):4190–6. (2014).
10. ALLUÉ, I. - **Microbiota and Gastrointestinal Diseases**. Anales de Pediatría. 83(6). (2015) 443.e1-443.e5.
11. KHANNA, S. et al. - **A Novel Microbiome Therapeutic Increases Gut Microbial Diversity and Prevents Recurrent *Clostridium difficile* Infection**. The Journal of Infectious Diseases. 8(FEB). (2016)
12. MARCHESI, J. et al. - **The Gut Microbiota and Host Health: A New Clinical Frontier**. Gut (2016). (65):330–339

13. JOHANESEN, P. - **Disruption of the Gut Microbiome: Clostridium difficile Infection and the Threat of Antibiotic Resistance.** Genes (2015), 6, 1347–1360.
14. MACKIE, R.; SGHIR, A.; GASKINS, H. – **Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract.** The American Journal of Clinical Nutrition (1999); 69:1035S–45S.
15. QUIGLEY, E. et al. – **Gut Bacteria in Health and Disease.** Gastroenterology & Hepatology (2013), 9(9): 560–569.