



Sílvia Raquel França Gonçalves

# O MICROBIOMA INTESTINAL HUMANO E AS SUAS IMPLICAÇÕES NA SAÚDE

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sílvia Raquel França Gonçalves

# O MICROBIOMA INTESTINAL HUMANO E AS SUAS IMPLICAÇÕES NA SAÚDE

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pela Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Sílvia Raquel França Gonçalves, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2011102890, declaro assumir toda 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 e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de setembro de 2016.

---

(Sílvia Raquel França Gonçalves)

A Tutora

---

(Dra. Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva)

A Aluna

---

(Sílvia Raquel França Gonçalves)

*Com a finalização do meu percurso académico, não posso deixar de prestar o meu sincero agradecimento às pessoas que dele fizeram parte.*

*Em primeiro lugar aos meus pais e irmã por todo o apoio e força incondicional em todos os momentos e decisões, por nunca me deixarem desistir perante as adversidades, pela coragem e valores transmitidos e principalmente por ensinarem a trabalhar e lutar pelos meus sonhos. Não seria a pessoa que sou hoje sem vocês. Devo-vos tudo.*

*Aos restantes familiares, por sempre terem uma palavra de incentivo e um gesto de carinho  
Aos meus verdadeiros amigos e colegas que foram fundamentais neste percurso e que sempre me acompanharam nos bons e maus momentos, nas vitórias e derrotas, sempre com uma palavra de incentivo e apoio. Levo-vos prá vida!*

*Por fim, mas não menos importante, agradeço à minha orientadora Dr.ª Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva por toda a paciência e ajuda prestado na elaboração desta monografia.*

*“O que sabemos é uma gota. O que não sabemos é um oceano.”*  
(Isaac Newton)

## **INDICE GERAL**

DICIONÁRIO DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. O MICROBIOMA HUMANO.....	5
2.1. Microbioma Intestinal Humano.....	7
2.2. Composição e Importância do Microbioma Intestinal.....	8
2.3. Métodos de sequenciação e análise para pesquisa do Microbioma Intestinal.....	9
2.3.1. Sequenciação do gene 16S rRNA.....	10
2.3.2. Sequenciação Metagenômica.....	11
2.3.3. Sequenciação Metatranscriptômica.....	11
2.3.4. Análise do Viroma.....	12
3. DIETA MEDITERRÂNICA.....	13
3.1. Influência da Dieta Mediterrânea na composição e funções do Microbioma Intestinal.....	15
3.2. Influência da Dieta Mediterrânea no Prevenção de Doença.....	19
4. TERAPIA MEDICAMENTOSA NO TRATAMENTO DE PATOLOGIAS ASSOCIADAS À ALTERAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL EM CONJUNTO COM A DIETA MEDITERRÂNICA.....	22
4.1. Probióticos.....	22
4.2. Prebióticos.....	23
4.3. Simbióticos.....	24
4.4. Transplante Bacteriano Fecal.....	24
5. PERSPETIVAS FUTURAS.....	25
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

## **DICIONÁRIO DE ABREVIATURAS**

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

**LPS** – Lipopolissacarídeo Bacteriano

**MUFA** – Ácidos Gordos Monoinsaturados (do inglês: *Monounsaturated Fatty Acids*)

**NGS** – Sequenciação de Nova Geração (do inglês: *Next Generation Sequencing*)

**OTU** – Unidade Operacional Taxonômica

**PCR** – Reação de Polimerase em Cadeia (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)

**PUFA** – Ácidos Gordos Polinsaturados (do inglês: *Polyunsaturated Fatty Acids*)

**rRNA 16S** – Ácido Ribonucleico Ribossomal 16S (do inglês: *16S Ribosomal Ribonucleic Acid*)

**SFA** – Ácidos Gordos Saturados (do inglês: *Saturated Fatty Acids*)

**SCFA** – Ácidos Gordos de Cadeia Curta (do inglês: *Short-chain fatty acid*)

**UNESCO** – Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura



## **RESUMO**

O Microbioma Humano é definido como a comunidade de microrganismos e dos seus genes, que colonizam zonas superficiais ou profundas do corpo humano. O desenvolvimento do microbioma humano é um processo dinâmico, variando ao longo da vida coexistindo em sinergia com o seu hospedeiro.

O trato gastrointestinal, mais precisamente o intestino, é o local do organismo humano que alberga o maior número e diversidade de microrganismos, exercendo uma maior influência sobre os mecanismos homeostáticos humanos. Assim, alterações ao nível da homeostasia do microbioma intestinal humano, podem estar associadas a diversas doenças como a *diabetes mellitus*, a obesidade, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e doenças metabólicas. No entanto, as consequências dessas alterações podem ser reduzidas por influência de determinadas fatores nomeadamente a dieta mediterrânica, através do sinergismo entre os alimentos e os seus componentes, juntamente com terapias medicamentosas, como o uso de probióticos, prebióticos ou o método de transplante bacteriano fecal. Estes fatores modelam o microbioma humano, impedindo o desenvolvimento e prevalência das doenças, contribuindo para uma vida mais saudável.

Há ainda um longo caminho a percorrer nesta área e espera-se que, num futuro próximo, surjam avanços no tratamento das patologias associadas ao microbioma intestinal, a partir do conhecimento mais aprofundado deste.

**Palavras Chave:** Microbioma Intestinal Humano, Dieta Mediterrânica, Modelação, Prebióticos, Probióticos, Simbióticos, Transplante Bacteriano Fecal.

## **ABSTRACT**

The human microbiome is defined as a microorganism community and its genetic code. The human microbiome colonizes different parts of human body, lying in greater abundance on the gut. Its development is dynamic process, varying through the different life stages. It coexists in a synergetic relation with the human host. Thus, its physiology is influenced by the performance of metabolic functions and the immune system growth.

Gastrointestinal tract, particularly in the gut, is the anatomical region which accounts the highest quantity and widest diversity of microorganisms. Moreover, it has major influence over the human homeostatics mechanisms.

Variations in the intestinal microbiome homeostasis level, tend to be associated to several diseases such as diabetes mellitus, obesity, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases or metabolic diseases. Nevertheless, the consequences of these variations may be minimized by the influence of several factors like the mediterranean diet. Through the synergism between food and its components, drug therapies, such as the use of probiotics, prebiotics and fecal bacterial transplant method, these factors may modulate the human microbiota. Leading to the prevention in the development and prevalence of illnesses, contributing for a healthier life.

There is still an ample room for further researches in this field of analysis. However, it is expected that, in the nearby future, some discoveries may lead to advances in the pathologies' treatments connected with the intestinal microbiome. *Per contra*, it is central a deeper knowledge concerning the whole human microbiome.

**Key Words:** Human Intestinal Microbiome, Mediterranean Diet, Modulation, Probiotics, Prebiotics, Fecal Bacterial Transplantation.

## **I. INTRODUÇÃO**

O número de bactérias no corpo humano é dez vezes superior ao número de células humanas, pelo que cada indivíduo apresenta 10 a 100 bilhões de células microbianas que se encontram em simbiose com o hospedeiro<sup>[1]</sup>.

Alguns indivíduos compartilham mais de 99,9% do genoma humano, no entanto, contêm entre 70% a 90% de diferenças no microbioma, sendo que cada ser humano possui um microbioma único. Este contém pelo menos 100 vezes mais genes do que o genoma humano, no entanto, é mais fácil de alterar que o genoma humano, especialmente através da dieta, contribuindo assim para a prevenção de doenças<sup>[1]</sup>.

O termo microbioma, pode ser definido como a comunidade de microrganismos presentes num local específico (pele, cavidade oral, intestino, etc.) ou todos os microrganismos comensais do ser humano como bactérias, *archaea*, vírus, *eucarya* e alguns eucariotas unicelulares, e pelos genes a eles associados. Geralmente o microbioma é estável ao longo do tempo e resistente a perturbações, mas pode variar no tempo e de acordo com a região corporal, na mesma pessoa e de pessoa para pessoa<sup>[2]</sup>. Alguns autores consideram este termo como sinónimo de microbiota<sup>[3]</sup>, no entanto, outros consideram o termo microbiota como os microrganismos pertencentes ao organismo humano que são isoláveis em cultura e sem incluir a sua análise genética<sup>[2]</sup>.

Os microrganismos que constituem o microbioma humano são adquiridos maioritariamente durante o nascimento. Durante a gestação, o feto é estéril mas a sua passagem através do trato geniturinário da progenitora, assim como, o contacto posterior com a pele e trato respiratório daqueles que o manuseiam são fatores de exposição e colonização, onde predominam os microrganismos que melhor se adaptam<sup>[4]</sup>. Ao longo do tempo, a composição e função do microbioma vai alterando, podendo ter consequências na idade adulta<sup>[5]</sup>.

O desenvolvimento do microbioma humano é um processo dinâmico, variando ao longo da vida e coexistindo em sinergia com o seu hospedeiro. Os microrganismos possuem a capacidade de colonizar zonas superficiais ou profundas do organismo humano como a pele, aparelho geniturinário, respiratório e gastrointestinal. A sua distribuição e diversidade dependem de um conjunto de fatores extrínsecos como a humidade, acidez, temperatura, dieta e intervenções terapêuticas e fatores intrínsecos como a idade e a genética do hospedeiro. É de reconhecer que os microrganismos que constituem o microbioma se encontram intimamente ligados à manutenção da homeostasia nos respetivos locais que

colonizam<sup>[3]</sup>. Contudo, devido à dificuldade na análise e diferenciação dos diferentes microrganismos que compõem a microbiota, apenas recentemente se começou a investigar com mais profundidade a composição e implicações da presença desta comunidade de microrganismos para o organismo humano. Este avanço súbito deve-se ao surgimento de técnicas moleculares aliadas à bioinformática que permitem a sequenciação dos genes<sup>[6]</sup>.

O trato gastrointestinal, mais precisamente o intestino, é o local do organismo humano que alberga o maior número e diversidade de microrganismos, exercendo uma maior influência sobre os mecanismos homeostáticos humanos. Como tal, nesta monografia, é dado especial atenção ao microbioma intestinal humano, uma vez que talvez seja o que tem mais impacto na saúde do indivíduo e que é mais facilmente modelado, inclusive pela dieta.

## **2. O MICROBIOMA HUMANO**

A distribuição e diversidade de comunidades microbianas em diferentes locais do corpo humano, tais como passagens nasais, cavidade oral, pele, trato gastrointestinal e urogenital, têm impacto na saúde do ser humano. Desta forma, a caracterização e compreensão da sua complexidade, poderá ser uma ferramenta de diagnóstico e de monitorização do estado de saúde, criando oportunidades para a melhorar através da manipulação do microbioma. Estes objetivos deram origem ao Projeto do Microbioma Humano (HMP), que visa o conhecimento do genoma microbiano, uma vez que os investigadores acreditam que a compreensão da saúde humana e das doenças passa pela compreensão de todo o microbioma<sup>[7]</sup>.

O HMP é um projeto criado em 2008, pelo Instituto Nacional de Saúde Americano (*National Health Institute*), em parceria com quatro centros de sequenciação, o Instituto de Broad (Cambridge, EUA), a Faculdade de Medicina de Baylor (Texas, EUA), a Faculdade de Medicina de Washington (Washington, EUA) e o Instituto J. Craig Venter (Maryland, EUA), para além de inúmeros investigadores<sup>[7]</sup>. Para além dos EUA, este projeto engloba também a Ásia e a União Europeia e tem como missão, gerar recursos que permitam a caracterização global do microbioma humano<sup>[7]</sup>.

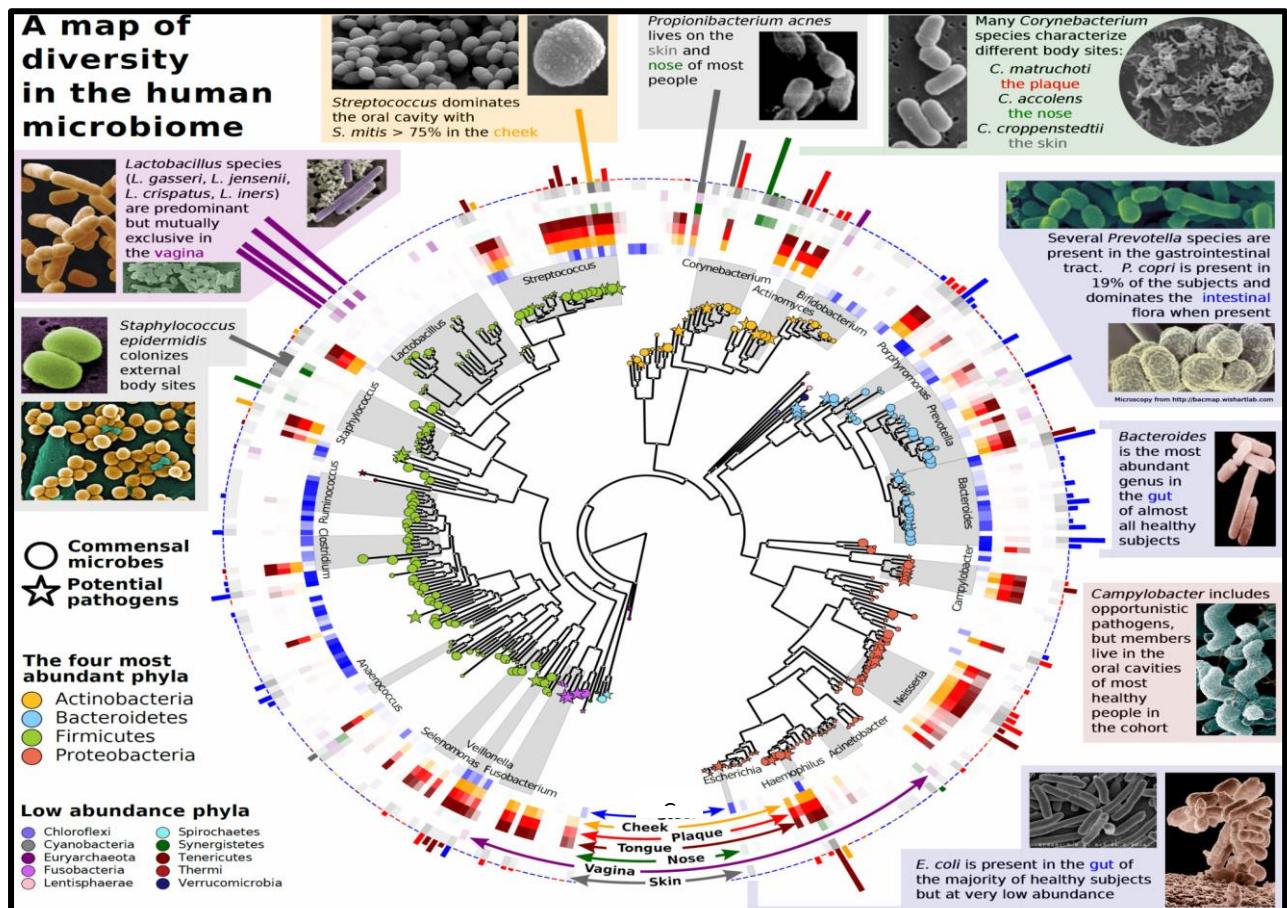


Figura I - Mapa representativo da caracterização do microbioma nas várias zonas do corpo humano e a sua abundância (Imagem retirada de 6).

Na figura I está representado um mapa demonstrativo da diversidade e abundância da comunidade microbiana presente no ser humano. Analisando a figura, verifica-se que na parte central estão presentes os microrganismos comensais e patogénicos mais abundantes, representados por círculos e por estrelas, respetivamente. De forma a distinguir os quatro principais filos bacterianos e, conseqüentemente os seus géneros, cada conjunto de estrelas ou círculos presentes no centro da imagem, apresenta uma cor diferente. Assim, a cor verde codifica para o filo Firmicutes (géneros: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*) e a cor rosa diz respeito ao filo Proteobacteria (géneros: *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Acinebacter*). Já o filo Actinobacteria (géneros: *Actinomyces* e *Bifidobacterium*) apresenta cor amarela e a cor azul corresponde ao filo Bacteroidetes (géneros: *Bacteroides*, *Prevotella* e *Porphyromonas*)<sup>[6]</sup>.

Por sua vez, na parte externa do círculo, estão representadas várias barras com cores diferentes. Cada cor está ligada a uma região do corpo e quanto maior a altura das barras, maior é a proporção de determinado género nessa região. Por exemplo, a zona vaginal é representada pela cor púrpura e como tal, confirma-se uma grande abundância de géneros *Lactobacillus* e o intestino, representado pela cor azul, evidencia a presença de géneros como

*Prevotella*, entre outros<sup>[6]</sup>. Desta forma, a análise deste mapa, permite conhecer quais os microrganismos mais abundantes do microbioma e o local preferencial para a sua colonização.

Concluindo, o Projeto do Microbioma Humano aborda algumas questões fundamentais e de grande relevância científica, fornecendo os parâmetros necessários para projetar, monitorizar e implementar estratégias de manipulação intencional do microbioma, de forma a otimizar o seu desempenho no hospedeiro<sup>[8]</sup>.

## 2.1. Microbioma Intestinal Humano

O microbioma intestinal humano é uma realidade complexa, tanto pela diversidade de espécies de microrganismos, como também, pela forma como as espécies interagem entre si e com o hospedeiro.

A composição da microbiota no intestino delgado, particularmente no duodeno, é semelhante à do estômago, já que o duodeno é a porção inicial do intestino onde chega o quimo, proveniente do estômago, tendo características ácidas. Além disso, é também neste local que existem secreções biliares e pancreáticas, que são responsáveis pela acidez. Contudo, observa-se uma diminuição gradual da acidez do duodeno até ao íleo, logo, é na transição íleo – cego que se verifica um aumento do número de microrganismos devido ao aumento da alcalinidade<sup>[10]</sup>.

O intestino delgado é colonizado por uma diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e parasitas, sendo os géneros bacterianos *Lactobacillus* e *Enterococcus* os mais predominantes neste local<sup>[10]</sup>. No entanto, é no intestino grosso, mais propriamente no cólon, que a composição é mais diversificada, mostrando uma variação mais considerável entre indivíduos. Como tal, é o local privilegiado para a ocorrência da fermentação, usando os microrganismos e os nutrientes provenientes da digestão dos alimentos<sup>[10]</sup>.

Como se pode então verificar, ao longo do trato gastrointestinal há diferenciação dos microrganismos presentes.

O microbioma intestinal é relativamente estável ao longo do tempo, no entanto, tende a sofrer alterações na sua composição devido a fatores ambientais como o estilo de vida, as condições sanitárias (higiene), terapêutica com antibióticos e o tipo de dieta, sendo esta última, o fator mais relevante na variação intrapessoal e interpessoal do microbioma. Assim, este fator será mais adiante abordado, dando-se especial ênfase à influência da dieta mediterrânica<sup>[11]</sup>.

Esta alteração no microbioma intestinal humano pode levar a disbiose, com implicações ao nível da saúde humana, levando a uma variedade de estados de doença. Nessa variedade estão incluídas as doenças inflamatórias intestinais, bem como o desenvolvimento de cânceros, nomeadamente, colo-rectal, gástrico e da próstata e a distúrbios metabólicos, podendo também levar a alergias e à obesidade<sup>[1]</sup>.

## 2.2. Composição e Importância do Microbioma Intestinal

A população microbiana do intestino é constituída por cerca de, pelo menos, 1800 géneros e aproximadamente 15000 a 36000 espécies bacterianas diferentes<sup>[12]</sup>, tendo já sido descritos cerca de 50 filos bacterianos. No entanto, existem 7 filos bacterianos predominantes: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria e Actinobacteria. As espécies mais abundantes são membros do filo Firmicutes (64%) e Bacteroidetes (23%). Relativamente ao filo Firmicutes, este inclui géneros como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, entre outros, enquanto que os Bacteroidetes incluem géneros como o *Bacteroides*, *Prevotella* e *Porphyromonas*<sup>[13]</sup>.

Em menor percentagem, encontram-se os filos Fusobacteria (*Fusobacterium*), Proteobacteria (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*) e Actinobacteria (*Streptomyces*, *Bifidobacterium*)<sup>[14]</sup>. Embora estes organismos estejam presentes na maioria dos indivíduos, há sempre variações nas suas proporções e espécies presentes, concluindo-se que os filos Bacteroidetes e Actinobacteria são os menos suscetíveis a perturbações enquanto que os filos Firmicutes e Proteobacteria são os menos estáveis, e consequentemente, os mais suscetíveis a perturbações no microbioma<sup>[14]</sup>.

Anaeróbios facultativos, como *Escherichia coli* e aeróbios estritos como *Pseudomonas* estão presentes no intestino grosso, mas em menor número do que os anaeróbios estritos, representando cerca de 1 a 4% da flora intestinal. Os anaeróbios facultativos consomem todo o oxigénio, levando ao aparecimento de anaeróbios, tais como os géneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* e *Fusobacterium*<sup>[9]</sup>. A relação simbiótica estabelecida entre a microbiota intestinal e o hospedeiro permite, além de complementar a fisiologia do hospedeiro, manter a homeostasia do organismo, trazendo benefícios para a saúde humana.

A tabela seguinte, descreve as diferentes funções desempenhadas pela microbiota intestinal e a forma como estas influenciam a saúde humana.

**Tabela I – Sistematização das funções do microbioma e o seu impacto na saúde humana**  
(Tabela adaptada de 14).

Função	Caraterísticas
<p align="center"><u>Função Protetora do Sistema Imunológico</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prevenção da colonização por microrganismos patogénicos.</li> <li>• Produção de mucina como barreira para a diminuição da capacidade de adesão de microrganismos patogénicos.</li> <li>• Produção de substâncias com atividade antibacteriana no intestino, prevenindo a colonização de patogénicos (bacteriocinas).</li> <li>• Regulação da Angiogénese Intestinal.</li> <li>• Estimulação imunológica, conferindo ao hospedeiro proteção contra muitos patogénicos.</li> </ul>
<p align="center"><u>Função na Digestão e Nutrição</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controlo do Apetite e Saciedade.</li> <li>• Produção de nutrientes e vitaminas como K e B12, ácido fólico e ácidos gordos de cadeia curta como o acetato, propionato e butirato.</li> <li>• Produção de enzimas (processamento de alimentos para melhor obtenção de nutrientes e eficácia na manutenção/ reparação de tecidos e órgãos).</li> </ul>
<p align="center"><u>Função Anti-Inflamatória</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias.</li> </ul>

### **2.3. Métodos de sequenciação e análise para pesquisa do Microbioma Intestinal**

Os estudos que envolvem o microbioma têm vindo a suscitar grande interesse na comunidade científica. Estes consistem na análise da estrutura e da dinâmica das comunidades microbianas, as relações que estabelecem entre si e o seu potencial na saúde e na doença<sup>[16]</sup>.



Os primeiros estudos microbianos foram baseados na cultura e isolamento dos microrganismos, no entanto, estas técnicas falham pela dificuldade no crescimento de alguns microrganismos intestinais por técnicas *in vitro* convencionais. Estas não permitem a deteção de microrganismos nutricionalmente muito exigentes, tornando o seu crescimento difícil de alcançar por estes meios<sup>[6]</sup>.

Então, de forma a aumentar a capacidade de estudo do microbioma e da microbiota, novas técnicas analíticas e de sequenciação associadas à bioinformática foram desenvolvidas, tais como a sequenciação do gene RNA ribossomal 16S (16S rRNA), a metagenómica, a metatranscriptómica e a análise do viroma<sup>[16]</sup>.

### **2.3.1. Sequenciação do gene 16S rRNA**

O gene 16S rRNA é um marcador genético bacteriano, altamente conservado entre diferentes espécies de bactérias e de *archaea*, que permite identificar a abundância e diversidade destes microrganismos<sup>[16]</sup>. Além de regiões conservadas, este gene contém regiões hipervariáveis que podem sofrer modificações num curto espaço de tempo e que são utilizadas para evidenciar diferenças entre as bactérias<sup>[16]</sup>.

Assim, tanto o gene inteiro como as regiões hipervariáveis, são amplificados através da técnica Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), onde o produto resultante é sequenciado e comparado com bases de dados existentes (ex: Genes Verde, myRDP, entre outras) permitindo a identificação dos microrganismos. Desta forma, é possível determinar a composição da comunidade microbiana, a sua abundância relativa e/ou respetiva filogenia, por comparação através de espécies já estudadas e presentes nas bases de dados<sup>[16]</sup>.

Este método de sequenciação do gene 16S rRNA apresenta vantagens, quer ao nível da rapidez, facilidade ou a nível de custo. No entanto, este pode muitas vezes ser tendencioso e levar a resultados ambíguos<sup>[17]</sup>.

Concluindo, o uso do gene 16S rRNA como molécula de identificação, permite a caracterização e compreensão dos microrganismos através da criação de perfis de composição taxonómica e filogenética das comunidades microbianas, alcançando-se uma maior clareza em relação a doenças complexas como a obesidade ou doenças inflamatórias intestinais<sup>[1]</sup>.

### **2.3.2. Sequenciação Metagenómica**

Contrariamente à análise do gene 16S rRNA, a sequenciação metagenómica tem como princípio, a análise dos genomas de comunidades microbianas, num determinado ambiente, a partir da sequenciação genómica do DNA total<sup>[18]</sup>. O DNA é cortado em pequenos fragmentos e sequenciado de forma independente. Desta forma, enquanto algumas sequências dão informação taxonómica, outras fornecem dados relativos à função biológica dos genes dentro da comunidade bacteriana. Tal como acontece no método anteriormente descrito, as informações obtidas são comparadas com as respetivas sequências de DNA presentes nas bases de dados, que contêm as espécies conhecidas<sup>[19]</sup>. Existe assim uma compreensão da comunidade bacteriana e da sua interação com o hospedeiro, de forma a obter perfis de comunidades microbianas a partir do seu DNA<sup>[19]</sup>. Naturalmente também este método tem desvantagens, nomeadamente a criação de uma grande quantidade de dados que dificultam a análise informática, a dificuldade em associar certos genes à sua espécie correspondente e a impossibilidade de representação de todos os genes<sup>[20]</sup>.

### **2.3.3. Sequenciação Metatranscriptómica**

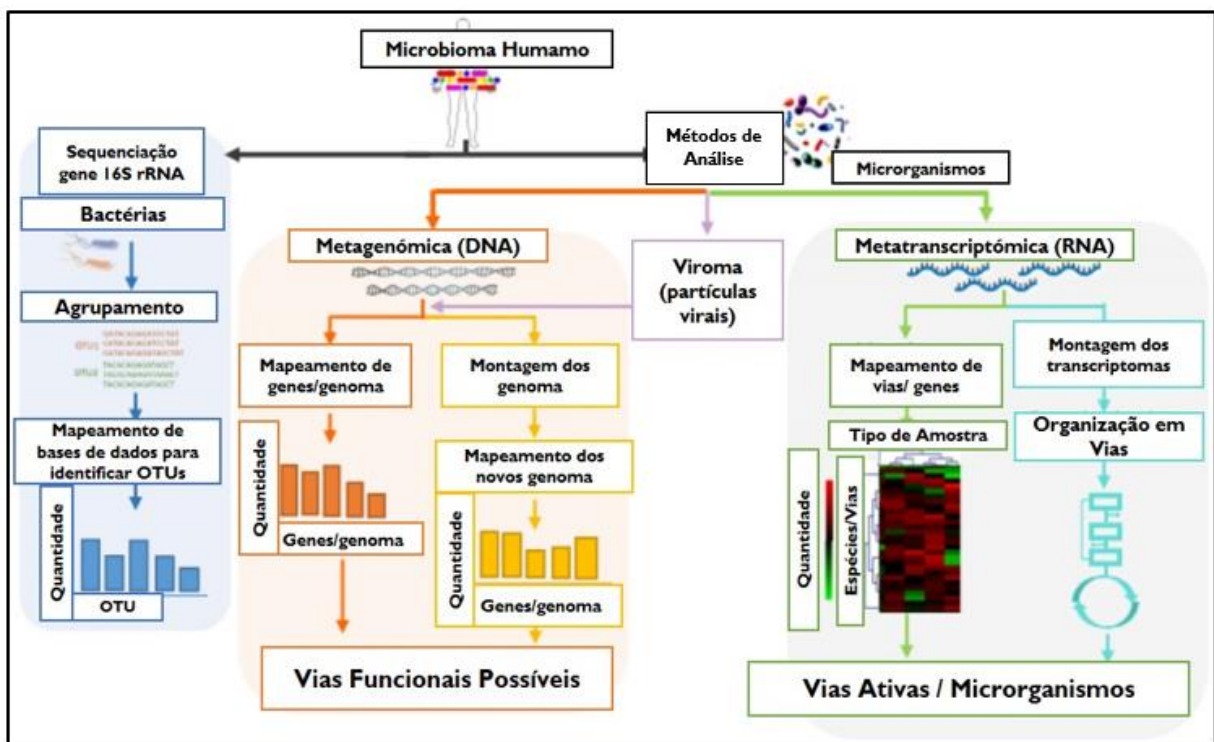
A sequenciação metatranscriptómica vem complementar as limitações da metagenómica, possibilitando o acesso ao metatranscriptoma de todo o genoma microbiano, ou seja, ao conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossómicos, RNAs transportadores e os microRNAs). Assim, este método reconhece os genes que estão a ser expressos num determinado ambiente e consegue monitorizar todas as alterações que ocorrem durante a transcrição, obtendo-se uma visão mais abrangente da expressão dos perfis genéticos e de dados funcionais<sup>[18]</sup>.

Paralelamente aos métodos atrás referidos, a bioinformática, é também uma ferramenta muito utilizada como complemento destes métodos, permitindo a organização e o estabelecimento das relações entre as informações biológicas recolhidas<sup>[20]</sup>. O conhecimento e compreensão do genoma humano e dos microrganismos que nele habitam, principalmente ao nível do intestino, levam ou podem levar a processos mais eficazes de diagnóstico, terapêutica e prevenção de patologias, com base na comparação entre o microbioma de indivíduos saudáveis e de indivíduos doentes<sup>[18]</sup>. Como tal, a análise do microbioma pode vir a fazer parte do quotidiano na prática clínica<sup>[17]</sup>.

### 2.3.4. Análise do Viroma

Por último, também é possível a análise do viroma, através da sequenciação de todas as partículas virais. Este estudo tem sido importante para entender o envolvimento dos vírus na disbiose microbiana, nomeadamente através da presença de bacteriófagos<sup>[16]</sup>.

Vários estudos demonstram que a composição e abundância de bactérias tem sofrido alterações, existindo um aumento de bacteriófagos<sup>[16]</sup>. Estes, são vírus com ação antibacteriana, promovendo a lise das bactérias e oferecendo benefícios ao seu hospedeiro. Foi assim demonstrado que os bacteriófagos, podem acelerar a evolução genómica do microbioma do hospedeiro, levando a adaptações funcionais da comunidade bacteriana. Como fazem parte do microbioma humano, também estes podem ser ativados pela dieta ou por hábitos, o que sugere que a relação entre bactérias e vírus pode estar presente na obesidade ou diabetes, por exemplo<sup>[16]</sup>.



**Figura 2** - Esquema sintetizado dos vários métodos analíticos e de sequenciação de análise do microbioma humano (Imagem adaptada de 16).

A figura 2, esquematiza as diferentes estratégias de sequenciação e análise associadas à bioinformática para a análise do microbioma humano. No que diz respeito ao gene 16S rRNA, as sequências resultantes são agrupadas em unidades operacionais taxonómicas (OTUs), ou seja, sequências que são semelhantes entre si, de forma a identificar unidades

taxonômicas por comparação com bases de dados, sendo a quantidade de OTUs calculada para cada amostra.

Na análise metagenômica, as sequências de DNA obtidas são mapeadas para referenciar genomas / genes, ou então utilizadas para a montagem de novos genomas, caso não haja correspondência entre as sequências e as bases de dados. De seguida, a quantidade de genomas presentes / genes, tal como o potencial das sequências é avaliado, também por comparação com bases de dados já existentes<sup>[16]</sup>.

Na análise virômica, as partículas virais são primeiramente enriquecidas e posteriormente sequenciadas de forma a obter os genomas virais<sup>[16]</sup>.

Por fim, a análise metatranscriptômica, para além de analisar os genes ativos e as espécies da microbiota, também é aplicada para o mapeamento de sequências de RNA. Os resultados obtidos são usados para identificar as vias ativas dos genes e microrganismos<sup>[15]</sup>.

### **3. DIETA MEDITERRÂNICA**

O termo dieta, provem da palavra grega *diata*, que significa estilo de vida equilibrado e traduz exatamente o que a dieta mediterrânica representa. Dentro dos vários tipos de dieta, existe a dieta mediterrânica, considerada como património cultural, histórico, social, territorial e ambiental, que tem sido transmitido de geração em geração durante séculos, e que está intimamente ligado ao estilo de vida dos povos do Mediterrâneo<sup>[21]</sup>.

A dieta mediterrânica traduz um estilo de vida, e não apenas um padrão alimentar, que, juntamente com o exercício físico moderado e feito diariamente, favorecido pelo clima ameno e descanso, completam um estilo de vida que a ciência moderna nos convida a adotar em benefício da nossa saúde, tornando-a num excelente modelo de vida saudável. Como tal, em 2013, a dieta mediterrânica foi classificada como Património Imaterial da Humanidade pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO)<sup>[22]</sup>.

Este tipo de dieta é caracterizada pela abundância de alimentos de origem vegetal, como os cereais (pão, massas, arroz, milho, centeio, trigo, cevada), hortícolas, legumes, frutos oleaginosos, sementes e azeitonas, fruta fresca, leguminosas secas para além de laticínios, carne, pescado, ovos. Também se caracteriza pelo consumo reduzido de sal, o uso de azeite como principal gordura, ervas aromáticas, especiarias, cebola e alho, consumo moderado de vinho e o consumo adequado de água e infusões<sup>[22]</sup>.

Tendo em conta os alimentos característicos desta dieta, em termos de nutrientes e outros componentes, estão presentes em abundância, ácidos gordos monoinsaturados

provenientes sobretudo do azeite, fibras alimentares solúveis e insolúveis (provenientes dos cereais, hortícolas, sementes e frutos oleaginosos), antioxidantes, quer vitaminas antioxidantes (vitamina E, vitamina C, betacaroteno e outras), quer componentes como os bioflavonóides e outros componentes fenólicos. Estes estão presentes em grandes quantidades nas hortícolas e são fundamentais para o bem-estar, tal como, a utilização reduzida de sal. Para além disso, proporciona também o aporte de minerais, proteínas e hidratos de carbono, essenciais para o correto funcionamento do nosso organismo<sup>[21]</sup>.

Como dito anteriormente, a dieta mediterrânica assenta em mais conceitos para além da alimentação, tais como, a atividade física moderada (pelo menos 30 minutos durante todo o dia), o descanso e a convivência, já que para além do aspeto nutricional, a comida tem conotação social e cultural. Desta forma, pretende-se a manutenção de um estado físico e mental saudável<sup>[22]</sup>.

A figura 3, representa a nova pirâmide da Dieta Mediterrânica, apresentando na base os alimentos que devem ser consumidos em maior quantidade na alimentação diária. Por sua vez, nas camadas superiores estão representados aqueles que devem ser consumidos com moderação, reservando-se para ocasiões festivas. Contém também indicações de carácter cultural e social, intimamente ligadas ao estilo de vida do Mediterrâneo, assim como o número de porções aconselhado para a população adulta saudável, devendo ser adaptado às necessidades específicas de crianças, mulheres grávidas e outras condições de saúde<sup>[22]</sup>.

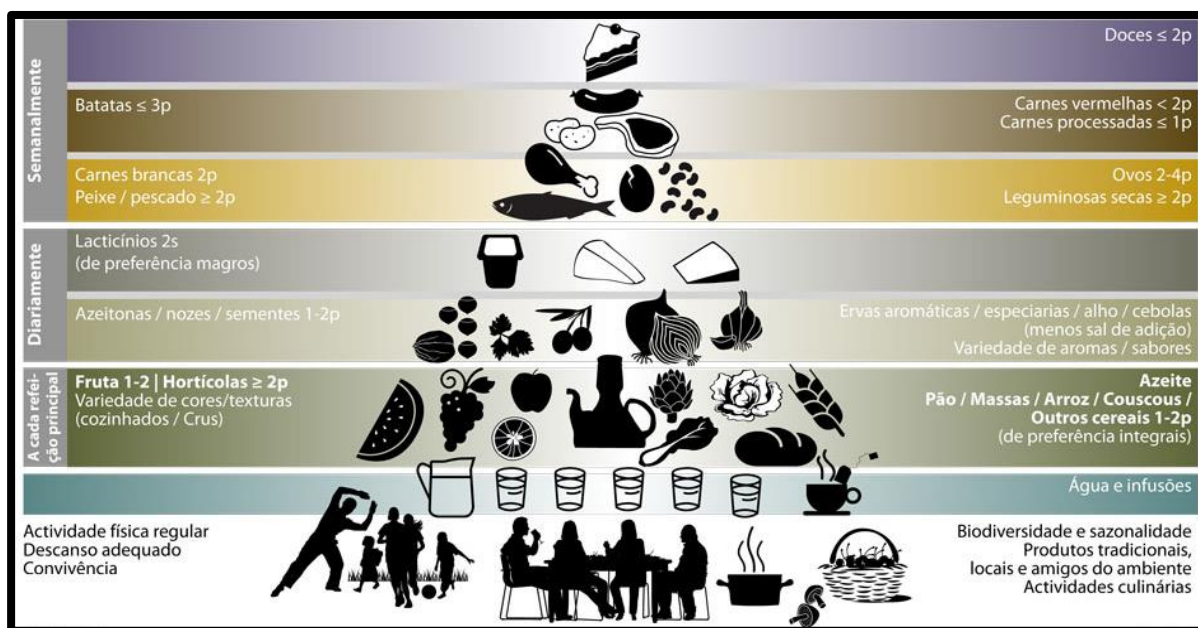


Figura 3 - A nova pirâmide da Dieta Mediterrânica (Imagem retirado de 22).

O efeito benéfico da dieta Mediterrânea deve-se ao sinergismo e combinação interativa dos nutrientes. Além disso, também demonstrou ser benéfica no tratamento da obesidade, *diabetes mellitus* tipo 2, doenças inflamatórias e doenças cardiovasculares<sup>[23]</sup>.

Concluindo, para avaliar o papel desta dieta no bem-estar, a análise dos nutrientes individualmente pode ser insuficiente para estabelecer informações entre os alimentos e o efeito benéfico na saúde e bem-estar do ser humano.

### **3.1. Influência da Dieta Mediterrânea na composição e funções do Microbioma Intestinal**

As bactérias constituintes da microbiota intestinal são capazes de produzir uma grande quantidade de metabolitos, os quais são dependentes de fatores como, a disponibilidade de nutrientes e as características do lúmen gastrointestinal, especialmente o pH<sup>[23]</sup>.

Como já foi referido anteriormente, a dieta é um dos fatores mais influentes nas alterações do microbioma intestinal. Desta forma, a dieta mediterrânea e os constituintes dos alimentos ingeridos, têm um papel fundamental na saúde e no próprio metabolismo da microbiota intestinal. Dentro destes constituintes, será dada especial importância às fibras, ácidos gordos de cadeia curta (SCFAs), ácidos gordos saturados (SFAs), ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs), ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), ácidos fenólicos e vitaminas, uma vez que são estes que melhor caracterizam a dieta mediterrânea e são os que mais influenciam o microbioma intestinal<sup>[24]</sup>.

A dieta mediterrânea, é caracterizada pela sua riqueza em cereais, laticínios, vegetais, leguminosas e frutos. Estes alimentos são ricos em hidratos de carbono, a principal fonte de energia do nosso organismo, sendo este macronutriente, o mais estudado no que diz respeito à relação entre microbioma e dieta. Os hidratos de carbono dividem-se em simples e complexos. Dentro dos simples, inserem-se a frutose, galactose, glucose (monossacarídeos) e a sacarose, lactose e maltose (dissacarídeos) que provêm dos vegetais, laticínios e frutos. Por sua vez, o amido, a celulose e o glicogénio fazem parte do hidratos de carbono complexos (polissacarídeos), provenientes dos cereais e constituintes maioritários das fibras<sup>[25]</sup>.

O aumento da ingestão de fibras traz benefícios já que a maior parte sofre fermentação no intestino grosso. Deste modo, estas têm impacto sobre a velocidade do trânsito intestinal, assim como, no aumento do número total de bactérias presentes<sup>[26]</sup>. Para além

disso, a sua capacidade de ligação aos sais biliares, permite a redução da absorção de gorduras e colesterol.

Estudos diversos indicam que nas dietas ricas em fibras e vegetais, tais como a dieta mediterrânea, ocorre um aumento do nível dos filos Bacteroidetes e Actinobacteria, e uma diminuição do filo Firmicutes, ao contrário do que acontece nas dietas ocidentais, ricas em gorduras. Isto deve-se à capacidade dos Bacteroidetes em degradar e fermentar polissacarídeos como o amido, aumentando desta forma, a proporção Bacteroidetes / Firmicutes<sup>[25]</sup>.

Relativamente à fermentação dos hidratos de carbono, os ácidos gordos de cadeia curta, como o butirato, acetato, propionato e os metabolitos como o lactato, piruvato, etanol e succinato, são os produtos finais resultantes deste processo<sup>[27]</sup>. Estes componentes estão presentes em elevados níveis, especialmente em indivíduos com padrões alimentares consistentes com a dieta mediterrânea, uma vez que estes se encontram correlacionados com o consumo de fibras, vegetais, frutos e leguminosas<sup>[23]</sup>. Os SCFAs são importantes na diminuição do pH do lúmen intestinal, inibindo a proliferação de agentes patogénicos, tais como espécies gram-negativas como a *E. coli*. e permitem o crescimento de bactérias benéficas como *Bifidobacterium* (filo Actinobacteria). Este filo é responsável por conferir proteção na invasão por patogénicos e ainda, na redução da proporção de Firmicutes. Também estão envolvidos na regulação do apetite, homeostasia da energia e glucose e melhoria da sensibilidade à insulina<sup>[28]</sup>.

O butirato é produzido por cerca de 5% a 10% de todas as bactérias do intestino, sendo as mais conhecidas pertencentes ao filo Firmicutes. Este é absorvido pela mucosa intestinal, sendo responsável pelo fornecimento de cerca de 70% de energia aos colonócitos (células do colón)<sup>[25]</sup>. Relativamente ao seu benefício no microbioma, este ácido gordo de cadeia curta está envolvido em vários processos, tais como processos anti-inflamatórios, através da diminuição da migração dos macrófagos após estímulo do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). O LPS é uma endotoxina presente na membrana exterior das bactérias Gram-Negativas, que afeta a metabolização da glucose e que provoca a resposta do sistema imunológico a um fator externo, promovendo uma resposta inflamatória. Esta capacidade anti-inflamatória do butirato vai influenciar negativamente a formação de tumores, diminuindo a capacidade de proliferação e induzindo a apoptose nas células cancerígenas, preservando a barreira intestinal<sup>[29]</sup>.

Quanto ao acetato, este é transportado pela corrente sanguínea até aos tecidos periféricos, sendo um substrato para a síntese de ácidos gordos e colesterol. Estudos

recentes indicaram que o acetato produzido por bactérias como *Bifidobacterium* ajuda na prevenção de infecções por agentes patogênicos tais como a *E. coli*<sup>[30]</sup>.

Por fim, o propionato, tal como o butirato, pode induzir a apoptose de células cancerígenas, nomeadamente as células do carcinoma do cólon humano. Esta descoberta pode ajudar na destruição das células do carcinoma de forma “saudável”<sup>[30]</sup>.

No que diz respeito aos lípidos ou gorduras, estes contêm três tipos de ácidos gordos, ácidos gordos saturados, ácidos gordos monoinsaturados e ácidos gordos polinsaturados.

O azeite é a principal gordura usada nesta dieta, sendo muito rico em ácidos gordos monoinsaturados. Como tal, a proporção entre ácidos gordos monoinsaturados / ácidos gordos saturados é elevada, contribuindo para a proteção da mucosa intestinal. Também os ácidos gordos polinsaturados presentes nos peixes, fornecem proteção contra doenças cardiovasculares, hipertensão e desempenham um papel importante na preservação das funções cognitivas<sup>[23]</sup>. Para além disso, os ácidos gordos são também responsáveis pelo transporte de vitaminas e fitoquímicos lipossolúveis (carotenos e licopenos), diminuem o tempo de esvaziamento gástrico e reduzem as secreções gástricas, ao mesmo tempo que estimulam o fluxo pancreático e biliar<sup>[31]</sup>.

Os compostos fenólicos estão presentes nos frutos, chá, café, vinho e chocolate, embora também possam ser encontrados em menor quantidade nos vegetais, cereais e sementes. São moléculas com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, constituindo a maior fonte de flavonóides e estando muito presentes na dieta mediterrânica. Estes promovem a saúde, estando ligados à prevenção de doenças como as cardiovasculares, doenças degenerativas e cancro, diminuição do colesterol total e níveis de proteína C-reativa (biomarcador do processo inflamatório). Os compostos fenólicos podem ser absorvidos no trato gastrointestinal, mas de forma lenta, o que faz com que muitas vezes, não sejam absorvidos. Quando tal acontece, estes têm um efeito benéfico a nível dos tecidos e do microbioma intestinal. Os fenóis presentes no chá têm a capacidade de inibir as bactérias patogênicas como o *Clostridium perfringens* e o *Clostridium difficile*, sendo que, ao mesmo tempo, não afetam as *Bifidobacterium*, *Lactobaccillus* spp. e *Clostridium* spp<sup>[14]</sup>. Também os fenóis do vinho tinto aumentam certas bactérias benéficas, entre elas, *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*<sup>[32]</sup>. Atualmente, os polifenóis, têm sido muito estudados pela comunidade científica devido à sua capacidade de reduzir a formação de radicais livres e eliminação dos mesmos, tendo assim uma função antioxidante<sup>[13]</sup>.



As vitaminas são uma classe de compostos orgânicos que ajudam na manutenção das funções fisiológicas do organismo. O microbioma intestinal contribui no aumento da síntese de vitaminas, tais como a vitamina K, B12 e ácido fólico, através do género *Bifidobacterium*.

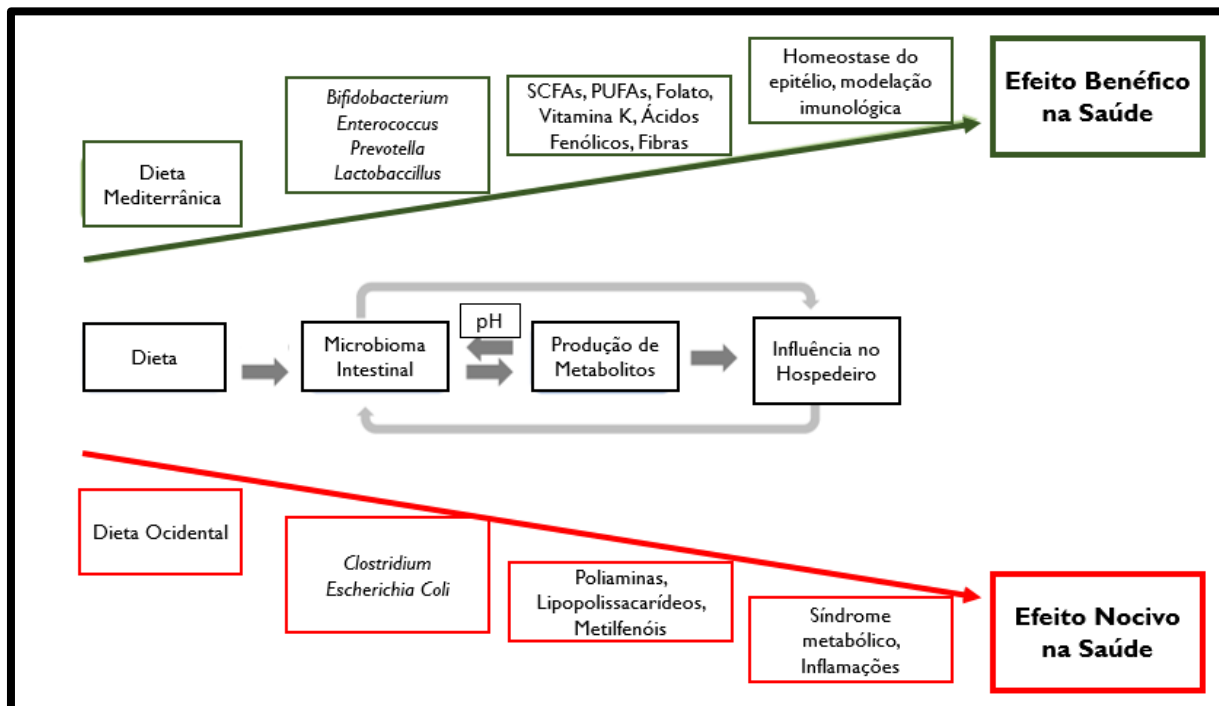
A vitamina K é principalmente sintetizada por elementos do filo Bacteroidetes, e está envolvida na prevenção da osteoporose e no processo de coagulação, levando a sua deficiência a doenças cardiovasculares<sup>[25]</sup>.

A vitamina B12 é a única vitamina que é exclusivamente sintetizada pelo microbioma intestinal. Esta está envolvida na síntese da metionina e no metabolismo do ácido fólico, que por sua vez, tem um papel fundamental na replicação, reparação e metilação do DNA bem como na proliferação celular<sup>[19]</sup>.

O microbioma intestinal também está relacionado com o desenvolvimento de obesidade, possuindo a capacidade de modificar a regulação e o armazenamento de energia obtida a partir dos alimentos<sup>[14]</sup>. Para além disso, a sua capacidade em extrair energia adicional aos alimentos não digeridos e a regulação do armazenamento de massa gorda, influencia o metabolismo do hospedeiro e afeta a adiposidade<sup>[14]</sup>.

Tendo em conta que a obesidade é a acumulação anormal ou excessiva de gordura por ingestão em excesso de calorias na dieta, diversos estudos demonstram uma maior proporção de filo Firmicutes num indivíduo obeso e uma menor proporção de filo Bacteroidetes, sendo que esta proporção fica normalizada após a perda de peso. Como o filo Firmicutes não tem a capacidade de metabolizar eficazmente as calorias ingeridas, estas não são transformadas em energia e acumulam-se sob a forma de gordura, ocorrendo um desequilíbrio do tecido adiposo, levando consequentemente à obesidade<sup>[34]</sup>. Assim, verifica-se que o desequilíbrio do microbioma influencia a maneira como a energia é extraída dos alimentos e armazenada, levando a distúrbios metabólicos<sup>[34]</sup>. Foi também comprovado que não foram apenas as bactérias destes filios que sofreram alterações na sua proporção, mas um vasto grupo de bactérias. No entanto, são estes dois filios que dominam o microbioma, mantendo uma estabilidade interindividual notável ao longo do tempo<sup>[14]</sup>.

Segundo o conceito de dieta mediterrânica, também o estilo de vida influencia ao nível da obesidade e consequentemente na prevenção dos diabetes. Os principais componentes da dieta que conferem proteção contra os diabetes, estão contidos nas fibras e gorduras vegetais, tal como o azeite devido à sua riqueza em ácidos gordos monoinsaturados<sup>[23]</sup>.



**Figura 4** - Esquemática da Influência da dieta no microbioma intestinal e na saúde do hospedeiro (Imagem Adaptada de 31).

A figura 4 representa as interações que se estabelecem entre a microbiota intestinal, a dieta e os metabolitos microbianos e que pode resultar num efeito nocivo ou benéfico na saúde do hospedeiro<sup>[31]</sup>. Como se verifica então na figura, os metabolitos microbianos influenciam a composição da microbiota intestinal por alteração do pH intestinal, podendo este ser regulado pelos hábitos alimentares do hospedeiro, nomeadamente através da adoção da dieta mediterrânica, que como foi dito anteriormente, apresenta benefícios para o ser humano, ao contrário das dietas ocidentais<sup>[31]</sup>.

### 3.2. Influência da Dieta Mediterrânica no Prevenção de Doença

A dieta mediterrânica, como evidenciado em diversos estudos, conduz a uma redução da mortalidade e da incidência das principais doenças crónicas, como cancro, doenças inflamatórias intestinais, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, alergias, diabetes e obesidade. Além disso, também está associada a uma melhor qualidade de vida e consequentemente, a uma melhoria nos perfis psicológicos, metabólicos e fisiológicos.

Relativamente ao cancro, diversos estudos mostraram que alguns componentes da dieta mediterrânica reduzem a ocorrência de cancro gástrico e alimentos como vegetais que não contenham amido, legumes e peixe devido ao seu conteúdo em PUFA<sup>[23]</sup>. Componentes como o ácido ascórbico, carotenóides e outras vitaminas antioxidantes, são inversamente

correlacionadas com o cancro gástrico, neoplasias do aparelho digestivo superior e trato respiratório. Pelo contrário, o baixo consumo de frutos, vegetais e o elevado consumo de carne vermelha, salgados e alimentos defumados, aumentam o risco de desenvolvimento de cancro gástrico<sup>[23]</sup>.

Outro tipo de cancro como o cancro da mama, cuja etiologia é multifatorial, também está associado à dieta. Alguns autores, relatam que o consumo de vegetais, frutos, legumes, cereais integrais, peixe, carnes brancas, soja e alimentos com baixo teor de gordura mostram uma relação inversa com o risco de desenvolvimento deste tipo de cancro. Por sua vez, a ingestão de álcool está associada a um aumento do risco. Também nutrientes específicos da dieta mediterrânica, tais como as vitaminas C e E, betacarotenos e bioflavonóides exercem um efeito antioxidante em vias metabólicas de produção do estrogénio, promovendo uma ação protetora e reduzindo a proliferação de células<sup>[23]</sup>.

O consumo adequado de fibras, polifenóis, vitamina C e E, ácidos gordos monoinsaturados, fibras e betacarotenos provenientes da dieta mediterrânica, reduzem o risco de desenvolvimento de determinadas doenças crónicas como a doença arterial coronária, acidentes vasculares cerebrais, hipertensão arterial e algumas desordens gastrointestinais. Isto deve-se ao efeito antioxidante destes componentes, que ao protegerem as células contra os danos provocados pelas espécies reativas de oxigénio, diminuem os níveis de LDL, triglicérideos e pressão arterial<sup>[27]</sup>.

No que diz respeito às doenças neurodegenerativas, a dieta mediterrânica tem um papel importante na prevenção cognitiva, diminuição do risco de demência e na doença de Alzheimer. Graças aos componentes atrás descritos (vitamina C, E, B12, folato e carotenóides) e ao seu papel antioxidante, o stress oxidativo no envelhecimento do cérebro é neutralizado, reduzindo deste modo, o risco de doença de Alzheimer<sup>[23]</sup>. Estes componentes também exercem uma ação anti-inflamatória a nível cerebral, resultando numa inativação da cascata inflamatória e neurodegenerativa e melhorando a função cognitiva<sup>[24]</sup>.

Também doenças alérgicas como a asma ou a alergia atópica nas crianças, são influenciadas pela dieta mediterrânica. Neste caso, a adesão da progenitora a esta dieta durante a gravidez, protege as crianças contra a asma e alergias. Alguns autores demonstram que a amamentação prolongada até aos quatro meses de vida leva a uma menor taxa de asma na infância e tem um efeito positivo sobre as infeções respiratórias em crianças até aos seis anos de idade. Para além disso, determinados alimentos como frutos, legumes e laticínios, bem como nutrientes ricos em MUFAs e flavonóides têm um efeito benéfico na asma. Desta forma, a adesão da mãe a este tipo de dieta e a lactação, representam uma

estratégia preventiva para evitar o desenvolvimento de alergias e asma nas crianças e modelar o sistema imunológico, respiratório e digestivo do recém-nascido e consequentemente do adulto<sup>[23]</sup>.

A tabela 2, pretende sistematizar a influência da dieta mediterrânica na diminuição do risco de prevalência de doenças, como foi descrito anteriormente ao longo do ponto 3.2. Desta forma, através da tabela, pretende-se facilitar a identificação do estado de doença cuja prevalência diminui e quais os componentes benéficos presentes nos alimentos desta dieta, que levam a essa diminuição<sup>[23]</sup>.

**Tabela 2** - Esquemática da relação entre a dieta mediterrânica e o risco de prevalência de doenças  
(Tabela adaptada de 23).

<b>Fatores Influenciadores da Dieta Mediterrânica</b>	<b>Doenças</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frutos, vegetais, laticínios (antioxidantes, PUFA, flavonóides).</li> </ul>	<b>Asma e Alergias</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Azeite (MUFAS), frutos, vegetais, carnes brancas.</li> </ul>	<b>Doenças Cardiovasculares</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frutos, vegetais e leguminosas (polifenóis, fibras, minerais e vitaminas).</li> </ul>	<b>Doenças no Fígado</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frutos, vegetais (fitoesteróis, vitaminas C, E, carotenóides).</li> </ul>	<b>Doenças Gastrointestinais</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frutos, vegetais (fitoesteróis, vitaminas C, E, carotenóides) e cereais (fibras).</li> </ul>	<b>Doenças Intestinais</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Azeite e vinho tinto (polifenóis, PUFA), frutos e vegetais, vitamina C, E, B12, folato e carotenóides).</li> </ul>	<b>Doenças Neurodegenerativas</b>

#### **4. TERAPIA MEDICAMENTOSA NO TRATAMENTO DE PATOLOGIAS ASSOCIADAS À ALTERAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL EM CONJUNTO COM A DIETA MEDITERRÂNICA**

Como atrás referido, o efeito benéfico da dieta mediterrânica deve-se ao sinergismo e combinação interativa dos seus nutrientes, de forma a modelar o microbioma intestinal e diminuindo assim, o risco de prevalência de determinadas doenças como a obesidade, *diabetes mellitus* tipo 2, doenças inflamatórias e doenças cardiovasculares.

Desta forma, os probióticos e/ou prebióticos presentes na alimentação, como por exemplo nos iogurtes, vão auxiliar e potenciar as funções benéficas para o tratamento da disbiose, sendo uma alternativa muito atrativa no que diz respeito à regulação do microbioma intestinal.

Outra alternativa, que pode contribuir para o tratamento de determinadas patologias, é o transplante fecal, como será descrito posteriormente.

##### **4.1. Probióticos**

A Organização Mundial de Saúde define probióticos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde”, sendo que a sua maioria é composta pelos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*<sup>[36]</sup>. Estes são usados no tratamento de doenças associadas a disbiose microbiana, uma vez que alteram a comunidade microbiana, sendo portanto, uma alternativa muito atrativa no que diz respeito à regulação do microbioma intestinal<sup>[36]</sup>. É importante realçar que os probióticos têm diversos mecanismos de ação, tais como a proteção contra bactérias patogénicas e enterotoxinas, produção de compostos antimicrobianos e redução do pH. Mais ainda, melhoram a barreira imunológica do intestino, tanto a nível da imunidade inata, aumentando a capacidade das células fagocíticas e dos monócitos, como ao nível da imunidade adquirida, aumentando a produção das imunoglobulinas IgG, IgM e IgA<sup>[33]</sup>. Estes também diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias que estão associadas a alergias sistémicas ou locais. Para além disso, estima-se que o consumo regular de probióticos, reduz o risco de cancro colo-retal e diminui os níveis de colesterol<sup>[34]</sup>.

O uso de probióticos tem demonstrado eficácia na profilaxia e como adjuvantes no tratamento de determinadas situações clínicas, como a obesidade, doença inflamatória intestinal e doenças cardiovasculares, entre outras. Apesar do contributo dos probióticos

contra a obesidade estar ainda por esclarecer, este é sugerido como sendo a alteração da microbiota intestinal e conseqüentemente os efeitos benéficos desta, que regulam o equilíbrio energético e o controle do peso<sup>[35]</sup>. De forma a potenciar a sua ação, os probióticos devem possuir determinadas características que lhes permitam sobreviver á passagem pelo sistema digestivo (resistência às enzimas proteolíticas e não conjugação com os sais biliares) e ter a capacidade de adesão ao epitélio para posterior colonização<sup>[36]</sup>.

Atualmente, os probióticos são muito importantes, quer a nível da alimentação (presentes, por exemplo, nos iogurtes) quer a nível da medicina (usados para o reequilíbrio da flora intestinal e melhoria do trânsito intestinal). Os mais usados na medicina são para o tratamento da diarreia, quer esta esteja associada a antibióticos, diarreia do viajante ou diarreia associada a síndrome do intestino irritável. Entre as opções terapêuticas, encontram-se os géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*<sup>[36]</sup>.

Uma vez que os probióticos contêm microrganismos vivos, há certos cuidados que devem ser tomados aquando da sua ingestão, nomeadamente ao nível da administração concomitante com antibióticos. Esta associação pode matar um grande número de organismos, reduzindo a eficácia dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*<sup>[36]</sup>. Estes também devem ser usados com precaução em doentes a tomar imunossuppressores (ex: ciclosporina e agentes citotóxicos), pois podem causar infeção ou colonização patogénica em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, estes também interagem com a varfarina, um fármaco anticoagulante<sup>[37]</sup>.

## 4.2. Prebióticos

Os prebióticos, são hidratos de carbono não digeríveis e não absorvíveis que, “após metabolização pelos microrganismos presentes no intestino, têm a capacidade de modelar a composição e/ou atividade do microbioma intestinal”<sup>[37]</sup>. Deste modo, são usados como substrato dos probióticos e da microbiota intestinal, permitindo mudanças específicas tanto ao nível da composição como da atividade da microbiota intestinal, otimizando as suas funções e benefícios ao nível da saúde e bem-estar<sup>[38]</sup>.

Como funções conhecidas, consideram-se a influência na flora intestinal, a promoção da absorção de cálcio, a regulação do metabolismo hepático dos lípidos e efeitos benéficos na perda e manutenção de peso<sup>[38]</sup>.

Os prebióticos mais usados são a inulina e outros fruto-oligossacárideos que promovem o crescimento de *Bifidobacterium spp* e que são incorporados em vários produtos, como por exemplo, nas bolachas e nos sumos<sup>[37]</sup>. No caso específico da inulina, esta é associada ao estímulo da atividade imunológica<sup>[38]</sup>. O leite humano também contém prebióticos e como tal, a presença destes compostos no intestino aumenta a proliferação de certas bactérias, especialmente *Bifidobacterium*. Diversos estudos revelam que os prebióticos apresentam efeito preventivo no eczema<sup>[38]</sup>.

### **4.3. Simbióticos**

Simbióticos consistem numa combinação de probióticos e prebióticos. Estes alteram significativamente a microbiota intestinal, apesar de não apresentarem efeitos preventivos contra o desenvolvimento de eczema infantil<sup>[38]</sup>.

Uma das maneiras de alterar favoravelmente o microbioma intestinal, é através do uso de prebióticos, probióticos e simbióticos. Estes agentes podem influenciar favoravelmente interações microbianas com o sistema imunológico e com o epitélio intestinal<sup>[38]</sup>.

### **4.4. Transplante Bacteriano Fecal**

O transplante bacteriano fecal, também denominado como bacterioterapia fecal, consiste no transplante de comunidades bacterianas de um indivíduo saudável para um indivíduo doente, ou seja, com o microbioma intestinal alterado<sup>[39]</sup>. Como as doenças surgem, muitas vezes devido a alterações no microbioma intestinal, a comunidade científica pôs a hipótese de restaurar o microbioma intestinal alterado, através do transplante fecal de um indivíduo saudável. Esta hipótese é baseada no pressuposto que os vários fenótipos de doença, são induzidos por alterações na genética do hospedeiro causando disbiose no intestino. No fundo, o transplante bacteriano fecal de um indivíduo saudável para um doente, pode restabelecer o equilíbrio de microrganismos no intestino<sup>[14]</sup>.

Neste processo, ocorre a introdução gradual e lenta de uma suspensão líquida com microrganismos de um dador para o trato gastrointestinal de um indivíduo com o microbioma alterado<sup>[39]</sup>.

Apesar de se encontrar em fase inicial, muitos são os estudos que demonstram a eficácia do tratamento. Assim, num dos estudos realizados, ocorreu a substituição de uma amostra

fecal por uma mistura de microrganismos altamente reprodutíveis que foram testados em ambiente controlado, de forma a verificar a presença de vírus e microrganismos patogênicos. Nessa mistura de microrganismos, estavam presentes 33 bactérias diferentes, entre elas, *F. prausnitzii*, *E.coli*, *Bifidobacterium longum* e *Bacteroides ovatus*. Ao serem administradas durante uma colonoscopia a indivíduos com a infecção por *Clostridium difficile*, estas bactérias mostraram ser eficientes no tratamento da infecção<sup>[40]</sup>.

Embora esteja a ser investigado para outras doenças associadas a disbiose intestinal (síndrome do cólon irritável e obesidade), o transplante bacteriano fecal é majoritariamente usado no tratamento de infecções por *Clostridium difficile*, mostrando uma maior eficácia no tratamento desta infecção comparativamente com o tratamento com antibióticos como a vancomicina<sup>[39]</sup>.

No que diz respeito às doenças metabólicas, um outro estudo demonstrou que o transplante bacteriano fecal com microrganismos produtores de butirato, melhorou a sensibilidade à insulina em indivíduos diabéticos e obesos e, como tal, poderá vir a ser uma terapêutica para combater o problema da obesidade e da diabetes<sup>[14]</sup>. Este tipo de tratamento também poderá ser recomendado a indivíduos que têm *diabetes mellitus* tipo II, mas neste caso, ainda não se efetua este tipo de tratamento devido ao receio da passagem de microrganismos patogênicos para o organismo recetor e também pela dificuldade na identificação e na triagem de doadores compatíveis<sup>[14]</sup>.

Finalizando, o transplante bacteriano fecal é uma abordagem terapêutica consideravelmente simples de executar, mas que levanta questões relacionadas com a falta de dados concretos sobre a segurança a curto e a longo prazo. Precisa de ser melhorada e, acima de tudo, suportada por dados concretos e fiáveis acerca da sua segurança<sup>[41]</sup>.

## **5. PERSPETIVAS FUTURAS**

O microbioma intestinal é considerado um “superorganismo” extremamente complexo. De forma a compreender os seus princípios básicos de organização e funções, a comunidade científica explorou duas grandes áreas de investigação; a área de diagnóstico, de forma a compreender a influência da composição da microbiota e a sua genética na prevenção e progressão de doenças, e a área de intervenção terapêutica, nomeadamente a nível da dieta, interação entre os microrganismos, uso de prebióticos e probióticos<sup>[6]</sup>. Além disso, fatores como a genética, localização geográfica do hospedeiro, idade, sexo e alimentação, entre



outros, representam questões decisivas para uma melhor compreensão do microbioma humano<sup>[42]</sup>.

Porém, novos estudos, novas investigações e novas técnicas serão indispensáveis e essenciais para compreender melhor o mundo do microbioma intestinal. As técnicas já existentes, como a metagenômica e a metatranscriptômica, necessitam de mais investigação de forma a colmatar algumas falhas.

Os dados até agora disponíveis demonstram que alterações benéficas na composição e organização do microbioma intestinal podem ter efeitos na melhoria da saúde do hospedeiro.

No século XXI, doenças como a obesidade e a *diabetes mellitus* são muito recorrentes em todo o mundo, afetando um número elevado de pessoas. Desta forma, o farmacêutico como agente na promoção da saúde, exerce um papel fundamental no alerta sobre estas doenças através da interação farmacêutico-utente. Como tal, o farmacêutico é responsável pela transmissão de forma confiante, clara e serena, de informação referente aos cuidados alimentares e para a prática de hábitos de vida saudáveis, alertando os utentes sobre os seus benefícios a longo prazo. Desta forma poderá contribuir para uma diminuição na prevalência de determinadas doenças relacionadas com a modelação do microbioma humano, evitando determinadas alterações que poderão ser fatais para o ser humano.

## **6. CONCLUSÃO**

O microbioma intestinal humano define-se como uma comunidade de microrganismos presentes num local específico e o conjunto dos seus genes. Através das técnicas de análise existentes, surgiu a oportunidade de realizar estudos que permitem a identificação e compreensão do microbioma e a possibilidade de o considerar como um alvo terapêutico importante. Este assume assim um papel fundamental na vida do ser humano, desde o nascimento até ao final da vida, estando intimamente ligado com a alimentação e com o estilo de vida adotados. Desta forma, cada pessoa tem a possibilidade de contribuir para a mudança através da adoção de um estilo de vida mais saudável.

O microbioma intestinal humano influencia o metabolismo, a absorção de nutrientes e o sistema imunológico do hospedeiro, logo a sua perturbação compromete a homeostasia do hospedeiro, ficando implicada em situações de patologias, como a obesidade, doenças gastrointestinais e doenças inflamatórias entre outras. Conclui-se assim que o equilíbrio

entre as espécies bacterianas presentes no intestino é fundamental para a homeostasia do organismo, sendo extremamente benéfica para a saúde humana.

Relativamente à dieta, a dieta mediterrânea, onde predominam alimentos como vegetais, frutos, leguminosas, cereais e azeite, permite a regulação do microbioma intestinal, diminuindo a prevalência de doenças e a taxa de mortalidade. Também alternativas como probióticos, prebióticos e o método de transplante bacteriano fecal contribuem para essa regulação.

Concluindo, a modelação do microbioma intestinal humano, através de alterações benéficas na sua composição e organização, nomeadamente através da dieta, é capaz de inverter o aparecimento e progressão de determinadas patologias. No entanto, apesar dos grandes avanços nos últimos anos, muito está ainda por descobrir e espera-se que futuras investigações tragam novas terapêuticas, resultando numa melhoria da qualidade de vida do ser humano.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. PARFREY, L. W., KNIGHT, R. - **Spatial and temporal variability of the human microbioma** - *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (2012). 5-7.
2. KHANNA, S., TOSH, P. K. - **A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease**. *Mayo Clinic Proceedings*. 1, 89 (2014), 107-114.
3. URSELL, L. K., CLEMENTE, J. C., RIDEOUT, J. R., GEVERS, D., CAPORASO, J. G., KNIGHT, R. - **The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbioma in key body sites**. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*. 5, 129 (2012), 1204-1208.
4. NELSON, M., H, DIVEN., M. A., HUFF, L. W., PAULOS, C. M. - **Harnessing the Microbiome to Enhance Cancer Immunotherapy**. *Journal of Immunology Research*. 2015 (2015), 1-12.
5. MARIAT, D., FIRMESE, O., LEVENEZ, F., GUIMARÃES, V., SOKOL, H., DORÉ, J., et al. - **The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbioma changes with age**. *BMC Microbiology*. 9 (2009), 1-6.
6. MORGAN, X., SEGATA, N., & HUTTENHOWER, C. - **Biodiversity and functional genomics in the human microbiome**. *Trends in Genetics*. 29, 1 (2014), 51-58.
7. **Human Microbiome Project (HMP)**. [Acedido a 9 de agosto de 2016] Disponível em: <http://hmpdacc.org/overview/about.php>.
8. TURNBAUGH, P., LEY, R., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C., KNIGHT, R., GORDON, J. **The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world**. *Nature*. 449, 7164 (2007), 1-17.
9. HUTTENHOWER, C., GEVERS, D., KNIGHT, R., ABUBUCKER, S., BADGER, J. H., CHINWALLA, A. T., et al. - **Structure, function and diversity of the healthy human microbiome**. *Nature*. 7402, 486 (2012), 207-214.
10. MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A., **Commensal and Pathogenic Microbial Flora in Humans**. *Medical Biology*. 4<sup>ed.</sup> (1996), 84-85.
11. BERNSTEIN, C. N., SHANAHAN, F. - **Disorders of a modern lifestyle-reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases**. *British Society of Gastroenterology*. 9, 57 (2008), 1185-1191.

12. DIBASE, J. K., ZHANG, H., CROWELL, M. D., KRAJMALNIK-BROWN, R., DECKER, G. A., RITTMANN, B. E. - **Gut microbioma and its possible relationship with obesity.** Mayo Foundation for Medical Education and Research. 4, 83 (2008), 460-469.
13. KASHTANOVA, D. A., POPENKO, A. S., TKACHEVA, O. N., TYAKHT, A. B., ALEXEEV, D. G., BOYTSOV, S. A. - **Association between the gut microbioma and diet: Fetal life, early childhood, and further life.** Nature Medicine. 22, 7 (2016), 713-722.
14. WALSH, C. J., GUINANE, C. M, O'TOOLE, P. W. COTTER, P. D. - **Beneficial modulation of the gut microbioma.** 588, 22 (2014), 4120-4130.
15. MAIER, E., ANDERSON, R. C., ROY, N. C. - **Understanding how commensal obligate anaerobic bacteria regulate immune functions in the large intestine.** Nutrients. 2072, 6643 (2015), 45-73.
16. BIKEL, S., VALDEZ-LARA, A., CORNEJO-GRANADOS, F., RICO, K., CANIZALES-QUINTEROS, S., SOBERÓN, X., *et al.* - **Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: Towards a systems-level understanding of human microbiome.** Computational and Structural Biotechnology Journal. 13 (2015), 390-401.
17. METHÉ, B. A., NELSON, K. E., POP, M., CREASY, H. H., GIGLIO, M. G., HUTTENHOWER, C. *et al.* - **A framework for human microbiome research.** Nature. 7402, 486 (2012), 215-221.
18. COX, M. J., COOKSON, W. O. C. M., MOFFATT, M. F. - **Sequencing the human microbiome in health and disease.** Human Molecular Genetics. 1, 22 (2013), 88-94.
19. GRICE, ELIZABETH., SEGRE, J. A., - **The Human Microbiome: Our Second Genome.** Annual Review of Genomics and Human Genetics. 13 (2012), 151-170.
20. SHARPTON, T. J., - **An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data.** Frontiers in Plant Science. 5, 209 (2014), 1-14.
21. **Dieta Mediterrânica | Alimentação Saudável** [Acedido a 15 de agosto de 2016]. Disponível em: <http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/biblioteca/dieta-mediterranica/>.
22. **Associação Portuguesa de Dietistas - Dieta Mediterrânica** [Acedido a 15 de agosto de 2016]. Disponível em: <http://apdietistas.pt/nutricao-saude/alimentacao-na-saude/dieta-mediterranea>.

23. CHERICO, D. F., VERNOCCHI, P., DALLAPICCOLA, B., PUTIGNANI, L. - **Mediterranean diet and health: Food effects on gut microbioma and disease control.** International Journal of Molecular Sciences. 15, 7 (2014), 11678-11699.
24. LOPEZ-LEGARREA, P., FULLER, N. R., ZULET, M. A., MARTINEZ, J. A., CATERSON, I. D. - **The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbioma composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state.** Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 23 (2014), 360-368.
25. FLINT, H. J. - **The impact of nutrition on the human microbiome.** Nutrition Reviews. 70 (2014), 510-513.
26. FLINT, H. J., SCOTT, K. P., DUNCAN, S. H., LOUIS, P., FORANO, E. - **Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut.** Landes Biosciences. 4, 3 (2012), 289-306.
27. BLAUT, M., CLAVEL, T. - **Metabolic diversity of the intestinal microbioma: implications for health and disease.** American Society for Nutrition. 137, 3 (2007), 7515-7555.
28. BYRNE, C. S., CHAMBERS, E. S., MORRISON, D. J., FROST, G. - **The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis.** International Journal of Obesity. 39 (2015), 1331-1338.
29. WEIR, T. L., MANTER, D. K., SHEFLIN, A. M., BARNETT, B. A., HEUBERGER, A. L., RYAN, E. P. - **Stool Microbiome and Metabolome Differences Between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adults.** Public Library of Science. 8, 8 (2013), 1-10.
30. ALBENBERG, L. G., WU, G. D. - **Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease.** Gastroenterology. 6, 146 (2014), 1564-1572.
31. TAN, H., O'TOOLE, P. W. - **Impact of diet on the human intestinal microbioma.** Food Science. 2 (2015), 71-77.
32. XU, Z., KNIGHT, R. - **Dietary effects on human gut microbiome diversity.** British Journal of Nutrition. 113 (2014), 1-5.
33. BERMON, S., PETRIZ, B., KAJENIEN, A., PRESTES, J., CASTELL, L., FRANCO, O. L. - **The microbioma: an exercise immunology perspective.** International Society of Exercise and Immunology. (2015), 70-79.

34. HOLLISTER, E. B., GAO, C., VERSALOVIC, J. - **Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health.** *Gastroenterology Journal.* 6, 146 (2014), 1449-1458.
35. ARORA, T., SINGH, S., SHARMA, R. K. - **Probiotics: Interaction with gut Microbiome and Antiobesity Potential.** *Nutrition.* 29 (2013), 591-596.
36. KECHAGIA, M. *ET AL.* - **Health Benefits of Probiotics: A Review.** *International scholarly research notices nutrition.* 2013 (2013), 1-8.
37. VYAS, U., RANGANATHAN, N. - **Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Gut and Beyond.** *Gastroenterology Research and Practice.* 2012 (2012), 1-16.
38. BARZ, M. LE, ANHÊ, F. F., VARIN, T. V, DESJARDINS, Y., LEVY, E., ROY, D., URDACI, M. C. - **Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders.** *Diabetes and Metabolism Journal.* 39 (2015), 291-303.
39. KHORUTS, A. M., DICKSVED, J., JANSSON, J. K., & SADOWSKY, M. J. - **Changes in the composition of the human fecal microbiome following bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea.** *Journal of Clinical Gastroenterology.* 44, 5 (2010), 354-360.
40. PETROF, E. O., GLOOR, G. B., VANNER, S. J., WEESE, S. J., CARTER, D., DAIGNEAULT, M. C., ALLEN-VERCOE, E. - **Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: “RePOOPulating” the gut.** *Microbiome.* (2013), 2-12.
41. KELLY, C. R., KAHN, S., KASHYAP, P., LAINE, L., RUBIN, D., ATREJA, A., WU, G. - **Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms and Outlook.** *Gastroenterology Journal.* 1, 149 (2015), 223-237.
42. DAVE, M., HIGGINS, P. D., MIDDHA, S., & RIOUX, K. P. - **The human gut microbiome: Current knowledge, challenges, and future directions.** *Translational Research.* 4, 160 (2012), 246-257.