



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE D
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

MARIA GUILHERME FRADE GRAÇA MUCHATA SIMÕES

***Desenvolvimento do Microbioma Intestinal Pediátrico:
Impacto na Saúde e na Doença***

ARTIGO DE REVISÃO NARRATIVA

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSOR DOUTOR RUI VASCO QUINTAS GRADIZ

PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO

ABRIL/2021

Desenvolvimento do Microbioma Intestinal Pediátrico: Impacto na Saúde e na Doença

Maria Guilherme Frade Graça Muchata Simões¹

Professora Doutora Anabela Mota Pinto²

Professor Doutor Rui Vasco Quintas Gradiz³

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Pólo III - Ciências da Saúde

Azinhaga de Santa Comba, Celas

3000-548 Coimbra, Portugal

¹ Aluna de 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal. Endereço eletrónico: mariagmsimoes@gmail.com

² Instituto de Patologia Geral, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

³ Instituto de Patologia Geral, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal. Endereço eletrónico: rgradiz@fmed.uc.pt

Índice

Resumo.....	4
Abstract.....	5
Lista de Acrónimos.....	6
Introdução.....	7
Metodologia.....	10
1 - O microbioma intestinal pediátrico e o seu impacto na saúde.....	11
1.1 - Eixo intestino-cérebro.....	13
2 - O microbioma intestinal pediátrico, a atopia e as doenças alérgicas.....	15
2.1 - Asma.....	16
2.2 - Eczema.....	19
2.3 - Rinite alérgica.....	20
2.4 - Alergias alimentares.....	20
3 - O microbioma intestinal pediátrico e as doenças autoimunes.....	22
3.1 - Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1.....	23
3.2 - Doença celíaca.....	26
4 - O microbioma intestinal pediátrico e as doenças metabólicas.....	29
4.1 - Obesidade.....	29
4.2 - Doença do fígado gordo não alcoólica.....	32
5 - O microbioma intestinal pediátrico e o cérebro.....	35
5.1 - Doenças do neurodesenvolvimento.....	37
5.1.1 - Doenças do espectro do autismo.....	38
5.1.2 - Perturbação de hiperatividade e défice de atenção.....	40
5.2 - Síndrome do intestino irritável.....	41
Conclusões.....	44
Agradecimentos.....	45
Índice de Tabelas.....	46
Bibliografia.....	47

Resumo

É reconhecido que o microbioma intestinal tem um papel ativo nos processos biológicos do hospedeiro, com o qual estabelece uma relação de simbiose. A colonização do intestino inicia-se *in utero* e continua ao longo da infância. Nesse período, os fatores de exposição ambiental do bebê estão implicados no estímulo para essa colonização e no controlo da composição do microbioma, influenciando o crescimento de bactérias comensais ou patogénicas.

Neste trabalho pretendeu-se rever a evidência científica recente que recai sobre o papel do microbioma intestinal pediátrico na fisiologia e na fisiopatologia do hospedeiro e descrever os principais efeitos patogénicos do seu desequilíbrio na idade pediátrica.

A revisão da literatura foi realizada no motor de busca *PubMed* da base de dados *MEDLINE*, para o período temporal de 2016 a 2020. Foram analisados artigos científicos originais, artigos de revisão narrativa e artigos de revisão sistemática, recorrendo-se ainda a um livro.

O equilíbrio do microbioma intestinal mostrou potenciar as defesas do hospedeiro e a manutenção da função cerebral equilibrada, e a disbiose condicionou doença. A composição do microbioma intestinal apresentou diferenças entre as crianças saudáveis e as doentes, nomeadamente ao nível das doenças alérgicas, autoimunes, metabólicas, do neurodesenvolvimento e do síndrome do intestino irritável. O tipo de parto, a dieta e a antibioterapia, às quais a criança foi exposta, mostraram relação com a propensão para o desenvolvimento de doença, pela modificação da flora intestinal. O desequilíbrio das funções fisiológicas do microbioma, bem como os metabolitos bacterianos, foram os principais agentes nos processos fisiopatológicos.

Conclui-se que o impacto do microbioma intestinal pediátrico na saúde e na doença do hospedeiro é evidente, sendo que uma colonização adequada do intestino permite o cumprimento das suas funções fisiológicas na criança.

Palavras-Chave: Microbioma, humano; Microbiota; todos, infância; Pediatria

Abstract

It is recognised that the gut microbiome has an active role in the biological processes of the host, being established a symbiotic relationship. The colonization of the gut begins *in utero*, continuing through childhood. During this period, the exposure to environmental factors in the first years of life is implicated in the stimuli of the colonization and the control of its compositions, influencing the growth of commensal or pathogenic bacteria.

It was intended to review the recent scientific evidence that demonstrates the role of the pediatric gut microbiome in children's physiology and physiopathology and describe the main pathogenic effects of its imbalance in pediatric age.

This literature review was conducted on PubMed MEDLINE, restricted to the period between 2016 and 2020. Were analysed original articles, narrative review articles and systematic review articles. A book was also used.

The balance of the gut microbiome showed to potentiate the host defences and the maintenance of a healthy cerebral function and dysbiosis has conditioned diseases. The compositions of the gut microbiome showed differences between healthy and unhealthy children namely in allergic, autoimmune and metabolic diseases, neurodevelopmental disorders and irritable bowel syndrome. The mode of delivery, the diet and antibiotic therapy, to which the infant was exposed, showed a relationship with the propensity to development of diseases, because of the modifications of the gut flora. The imbalance of the physiological functions of the microbiome and the bacterial metabolites were the main agents in the physiopathological processes.

In conclusion, the impact of the pediatric gut microbiome in health and disease revealed to be undeniable as the adequate colonization of the gut allows the execution of its physiologic functions in children.

Keywords: Microbiome, human; Microbiota; all, childhood; Pediatrics

Lista de Acrónimos

AGCC – Ácidos gordos de cadeia curta

DC – Doenças celíaca

DEA – Doenças do espectro do autismo

DM1 – Diabetes *mellitus* tipo 1

GABA – Ácido gama aminobutírico

HLA – Antígeno leucocitário humano

IgE – Imunoglobulina E

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

LPS – Lipopolissacarídeos

MODY2 – *Maturity onset diabetes of the young* tipo 2

NAFLD – Doença do fígado gordo não alcoólica

NASH – Esteato-hepatite não alcoólica

PHDA – Perturbação de hiperatividade e défice de atenção

PSD-95 – Proteína de densidade pós-sináptica 95

SII – Síndrome do intestino irritável

TEDDY – *The environmental determinants of diabetes in the young*

T_H1 – Linfócitos T auxiliares tipo 1

T_H2 – Linfócitos T auxiliares tipo 2

Introdução

O microbioma intestinal é definido como um ecossistema, complexo e dinâmico, constituído por uma população de triliões de microrganismos que coloniza o intestino humano e pelo conjunto dos seus genomas. Localiza-se maioritariamente no colón e é constituído por bactérias, Archaea, fungos, vírus e protozoários, [1-4] que estão envolvidos em inúmeros processos biológicos do hospedeiro. Para tal, estes microrganismos são reconhecidos pelo sistema imunitário humano como não patogénicos, pelo que, sendo comensais do intestino, estabelece-se uma relação de simbiose, permitindo uma homeostase fisiológica. [3,5-7]

Está provado que estes comensais do intestino têm um papel fulcral na manutenção da homeostasia do hospedeiro, uma vez que lhes são atribuídas as funções: digestão de componentes não digeríveis da dieta, facilitando a absorção de nutrientes importantes para o metabolismo e fisiologia; prevenção da colonização do intestino por microrganismos patogénicos, pela competição por nutrientes; fortalecimento do epitélio de barreira intestinal, e participação no desenvolvimento e maturação do sistema imunitário. [2,3,8-10] Por todas estas razões, um microbioma intestinal “saudável” é considerado imprescindível para o adequado desenvolvimento da criança nos primeiros anos, condicionando a sua saúde ao longo da vida. Tendo em conta o seu forte impacto na fisiologia do hospedeiro, quando há alterações no seu equilíbrio (disbiose), as suas funções ficam comprometidas numa fase precoce da vida, período crítico para o desenvolvimento da criança, o que pode levar ao surgimento de doenças a curto ou a longo prazo.

O desenvolvimento primordial do microbioma intestinal ocorre durante os primeiros anos de vida, e pensa-se que a primeira colonização do intestino ocorre *in utero*, tendo sido demonstrada a presença de microrganismos na placenta, no líquido amniótico, no cordão umbilical e no mecónio, o que vem contrariar a hipótese anterior de que o intestino do feto é estéril, bem como o ambiente no interior do útero. [1-3,6] Apesar dessa colonização *in utero*, a grande maioria dos microrganismos que se vão fixar no intestino são adquiridos posteriormente, sendo o período pós-natal crucial para o estabelecimento dos organismos pioneiros do microbioma.

A idade gestacional à nascença, o tipo de parto, a dieta, bem como a exposição a antibióticos são os principais fatores de influência na construção do microbioma intestinal pediátrico, sendo responsáveis pela alteração da sua constituição ao longo do tempo, num processo dinâmico.

Os bebés prematuros demonstraram diferenças importantes na colonização do microbioma do intestino, que podem ser associadas a um período alargado de internamento

hospitalar, à maior exposição a antibioterapia, bem como ao atraso na ingestão do leite materno. Verificou-se assim uma reduzida diversidade do microbioma e baixos níveis de *Bifidobacterium* e *Bacteroides* comparativamente a bebês de termo, o que predispõe à colonização do intestino por microrganismos patogênicos. [11,12]

Verificou-se uma diferença substancial na composição do microbioma intestinal de bebês nascidos por parto vaginal comparativamente ao microbioma dos nascidos por cesariana, essencialmente nos primeiros meses de vida. Os bebês nascidos por parto natural são expostos à flora vaginal e à flora fecal da mãe, [11-13] pelo que os gêneros bacterianos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão em maior abundância no intestino destes recém-nascidos. [13] Este último gênero mostrou-se benéfico, pelo que a sua aquisição é essencial no início da vida, ficando “atrasada” no parto por cesariana. [11] Este atraso na colonização por *Bifidobacterium*, que têm um impacto *major* na vida precoce e na saúde futura, pode ultrapassar a janela de oportunidade para o desenvolvimento do sistema imunitário, no qual participa, que ocorre durante os primeiros cem dias de vida. [14] O parto por cesariana, que tem vindo a ser cada vez mais generalizado, associa-se a um microbioma intestinal infantil colonizado por microrganismos potencialmente patogênicos e pró-inflamatórios presentes no ambiente hospitalar e por microrganismos comensais da pele da mãe. [1,10-13,15,16]

Estudos mostraram que a dieta exerce um papel preponderante na modelação do microbioma intestinal do bebê, sendo o fator mais relevante para a variação intra e interpessoal do microbioma. Esta dieta compreende o leite materno ou o leite de fórmula exclusivo (apenas quando a amamentação não é possível), nos primeiros meses de vida, passando para a diversificação alimentar a partir dos 4 a 6 meses, com a introdução de alimentos sólidos, período no qual ocorre a maior diversificação da composição do microbioma, pela fixação de bactérias capazes de metabolizar esses novos alimentos. [2,13] Foram documentadas diferenças na composição do microbiota (conjunto de microrganismos) intestinal entre bebês alimentados exclusivamente com leite materno e bebês alimentados com leite de fórmula exclusivo. [3,12,13,17] O leite materno tem propriedades que permitem uma atuação como probiótico e prebiótico, modulando o microbiota intestinal. Os probióticos são organismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas podem ter efeitos benéficos para a saúde, enquanto que os pré-bióticos são hidratos de carbono não digeríveis por enzimas humanas, que são fermentados por bactérias cólicas específicas, fomentando o seu crescimento seletivo no intestino. [18] Assim, o leite materno ajuda na construção do microbioma intestinal através da introdução de bactérias presentes na cavidade oral do recém-nascido e na pele do mamilo materno, e permite o crescimento seletivo da bactéria benéfica *Bifidobacterium* spp. pela presença dos oligossacarídeos do leite materno não digeríveis que atingem o cólon ainda intactos, [9,13] impedindo a proliferação de bactérias

menos favoráveis no intestino. Nos bebês alimentados exclusivamente com leite de fórmula verificou-se um aumento da diversidade do microbiota intestinal, com predomínio de *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*, e dos gêneros *Lactobacilli*, *Enterococcus*, *Bacteroides* e *Clostridia*, [3,13] com uma diminuição da riqueza em *Bifidobacterium*.

O ambiente onde o recém-nascido está inserido também demonstrou ter um papel na variabilidade do microbioma, sendo um dos primeiros o ambiente hospitalar pós-parto, [13] mais preponderante nos prematuros e nos partos por cesariana. A exposição a animais domésticos também mostrou ser capaz de moldar o microbioma intestinal do bebê. [10]

A antibioterapia, quer administrada à mãe durante a gravidez ou durante o parto, quer administrada ao recém-nascido após o seu nascimento, demonstrou contribuir para uma alteração da normal colonização do microbiota intestinal. Foi também observada redução da diversidade microbiana no intestino de crianças que receberam antibioterapia nos primeiros anos de vida. [19] A exposição a antibióticos cursa com alteração da composição do microbiota intestinal, [13] dificultando a colonização de microrganismos benéficos não resistentes, que serão substituídos por patógenos, [9] pelo que a utilização destes fármacos deve ser bem ponderada.

Assim, sabe-se que o desenvolvimento do microbiota intestinal ocorre essencialmente nos primeiros anos de vida, sendo necessário desenvolver estratégias para o seu desenvolvimento bem controlado durante esse período, [9] tendo em linha de conta que o microbiota “saudável” do bebê apresenta uma riqueza em *Bifidobacterium*, adquirido por via do parto vaginal e da amamentação. [1,5,17] E, ao contrário do que se pensava anteriormente, estudos recentes sugerem que continua a modificar-se para além dos 3 anos de idade, o que pressupõe que ao longo da infância existem oportunidades adicionais para intervenções, tendo como alvo o microbioma, que promovam a saúde ou previnam o desvio do microbiota. [4] Ao longo deste período, o microbiota vai adquirindo progressivamente uma composição mais parecida com a do adulto, apresentando-se com maior complexidade e relativa estabilidade. [5,15]

Posto isto, nesta revisão, pretendo debruçar-me sobre o papel do microbioma intestinal pediátrico na fisiologia e fisiopatologia da criança, bem como descrever os principais efeitos patogénicos do seu desequilíbrio, nomeadamente das várias patologias com origem na idade pediátrica nas quais se identificou disbiose do microbiota intestinal, com referência aos resultados dos trabalhos mais recentes publicados nesta área de estudo.

Metodologia

A temática desta revisão é vasta, bem como a literatura que lhe é inerente. Com este trabalho pretendeu-se analisar a diversidade de informação recente dentro da área da saúde onde o microbioma intestinal pediátrico mostrou estar implicado. Começou-se por uma pesquisa principal e exploradora do tema, realizada na *PubMed* da base de dados *MEDLINE* com a equação de pesquisa "*Gastrointestinal Microbiome*"[*Mesh*], à qual foram aplicados os filtros: "5 years", "humans", "Child: birth-18 years", "english", "portuguese" e "spanish", obtendo-se 1605 resultados, no período temporal entre 2016 a 2020, inclusive. Destes, foram selecionados, com base na leitura do título e do abstract, 556 artigos.

A equação da pesquisa principal foi guardada na "*MyNCBI*" em "*Saved Searches*" e ao longo da redação do trabalho, prestou-se atenção à categoria "*What's New*", para verificar a introdução no *Mesh* de artigos de potencial interesse para este trabalho, alguns dos quais foram selecionados.

Ao longo da leitura mais detalhada dos 556 artigos selecionados, procedeu-se à estruturação do trabalho com a seleção dos grupos de doenças a abordar, optando-se pelos que tinham maior volume de informação disponível. Apesar da grande amplitude de estudos que envolvem o microbioma intestinal na patologia do hospedeiro, ao longo da redação do trabalho identificou-se informação escassa sobre algumas patologias em concreto, dentro dos grupos de doenças escolhidos previamente. Houve necessidade de realizar pesquisas adicionais mais dirigidas, nomeadamente "*gut microbiome*"[*Mesh*] AND "*allergic rhinitis*"[*Mesh*] e "*gut microbiome*"[*Mesh*] AND "*irritable bowel syndrome*"[*Mesh*], com seleção de 4 artigos.

Foram também utilizadas algumas referências bibliográficas pertinentes da bibliografia da literatura revista, sem limite temporal.

Esta revisão da literatura acabou por ter por base 102 referências bibliográficas, das quais constam artigos originais, revisões narrativas, revisões sistemáticas e um livro.

1 - O microbioma intestinal pediátrico e o seu impacto na saúde

O microbioma intestinal (Tabela 1) é composto por bactérias, Archaea, fungos, vírus e protozoários. As bactérias são os microrganismos mais preponderantes e recaem sobre elas a grande maioria dos estudos científicos. O microbioma é então dominado por bactérias, sendo que são os filós Firmicutes e Bacteroidetes que se encontraram em maior quantidade. [20,21] Aos Firmicutes pertencem os géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* e *Mycoplasma*, enquanto que aos Bacteroidetes pertencem os géneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Porphyromonas*. Numa menor percentagem, estão presentes os filós Fusobacteria, Proteobacteria e Actinobacteria (que engloba o género *Bifidobacterium*). [21-24]

Tabela 1 - Composição do microbioma intestinal

Filos predominantes no microbioma intestinal	Géneros englobados
Firmicutes	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Mycoplasma</i>
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i>
Fusobacteria	
Proteobacteria	
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>

Uma das principais funções do microbioma intestinal é a degradação de componentes da dieta não digeríveis pelas enzimas humanas, como é o caso de hidratos de carbono (por exemplo, oligossacarídeos do leite materno), facilitando a absorção de nutrientes importantes para o metabolismo e fisiologia do organismo. Dessa fermentação no lúmen intestinal resultam ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), como o acetato, propionato e butirato, que mostraram papel na inflamação local e sistémica [18] e papel na indução dos linfócitos T reguladores. [21] Estes metabolitos são transportados através da membrana celular por transportadores de monocarboxilato, presentes não só no intestino, mas também no fígado e no cérebro. Relativamente aos recetores destes AGCC, foram identificados como estando

expressos nos leucócitos, reforçando o seu papel na imunorregulação. [18] Estes recetores foram também detetados no tecido adiposo, pelo que poderão ser reguladores da função do adipócito e dos níveis de lípidos no plasma. [18] O propionato mostrou influenciar as concentrações intracelulares de cálcio nos neutrófilos, enfatizando o seu papel na resposta imunitária. O butirato demonstrou ter uma marcada capacidade de influenciar a transcrição de genes, através de desacetilação de histonas, um processo epigenético que permite influenciar a expressão de genes importantes para os processos fisiológicos. Um desses genes é o de expressão das proteínas das *tight-junctions* da barreira intestinal, que mantêm a sua integridade, o que permite a manutenção da seletividade na absorção de substâncias presentes no lúmen intestinal, ajudando a controlar a inflamação. [7,18]

A grande maioria das exposições do sistema imunitário aos agentes externos é através do trato gastrointestinal, pelo que o início da colonização do intestino do bebé constitui um forte estímulo para o desenvolvimento do seu sistema imunitário, pela indução de respostas imunológicas, através da barreira intestinal, face à presença desses agentes estranhos, com os quais há necessidade da criação de uma relação de homeostasia. [7,25]

A barreira intestinal é constituída por componentes celulares, como o epitélio intestinal, e por componentes não celulares, nomeadamente a camada de muco localizada na face apical das células epiteliais. [7,25] O epitélio intestinal é uma camada celular simples constituída por enterócitos, células caliciformes e células de *Paneth*. [7] Entre estas células estão as *tight-junctions*, estruturas proteicas complexas, com função oclusiva, que permitem uma regulação da passagem paracelular de substâncias presentes no lúmen (proteínas, metabolitos patogénicos), evitando que estas atinjam a corrente sanguínea ou a lâmina própria, onde se localiza o sistema imunitário intestinal. [7] A porção mais externa da barreira intestinal é a camada de muco, que constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro no intestino. Esta camada é produzida pelas células caliciformes do epitélio intestinal, que libertam grânulos de MUC2, glicoproteínas que formam uma matriz de mucina no lúmen intestinal. [7] Esta camada minimiza o contacto direto dos microrganismos com o epitélio e ajuda também a retê-los, disponibilizando nutrientes que facilitam a sua fixação no intestino. [7,25] Por sua vez, as células de *Paneth* produzem peptídeos antimicrobianos (por exemplo, α -defensinas) que se fixam na matriz de mucina e ajudam a controlar a densidade microbiana no lúmen. [7] Os recetores *toll-like* das células dendríticas presentes na lâmina própria conseguem reconhecer antigénios bacterianos do microbiota, apresentando-os aos linfócitos B nos gânglios linfáticos mesentéricos, induzindo os plasmócitos na lâmina própria a produzir imunoglobulina A. A IgA atravessa o epitélio intestinal e liga-se às membranas das bactérias presentes no muco, impedindo a sua translocação através da parede intestinal. [25] O próprio microbiota intestinal, quando equilibrado, fortifica também esta barreira intestinal, na medida

em que, ajuda à manutenção das *tight-junctions*, como anteriormente referido, e dificulta a colonização do intestino por microrganismo patogénicos através da competição por nutrientes.

O microbioma intestinal é também importante para indução e estímulo de respostas do sistema imunitário, e a homeostase é mantida por um equilíbrio entre a estimulação de linfócitos e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. O sistema imunitário do bebé vai desenvolver-se pela resposta constante a componentes estruturais da célula microbiana. [18] Várias bactérias mostraram participar e influenciar positivamente as respostas do sistema imunitário inato pela estimulação à diferenciação dos linfócitos T reguladores (implicados na tolerância imunológica) ou pela indução de interleucina 10 (IL-10, citocina anti-inflamatória), conseguindo suprimir a inflamação. [18,25] Brown *et al.* [7] afirmam que estudos reconhecem microrganismos pertencentes ao microbioma como sendo capazes de induzir a ativação de linfócitos T reguladores no intestino, nomeadamente *Escherichia*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*. A função dos linfócitos T CD4⁺ (auxiliares) mostrou também ser estimulada pelo microbiota, através dos seus metabolitos (AGCC e polissacarídeos A). [25]

Brown *et al.* fazem referência a estudos em ratos *germ-free*, nos quais estes animais, desprovidos de microbioma intestinal, e conseqüentemente de todas as vias do sistema imunitário por ele induzidas, mostraram um desenvolvimento deficitário da imunidade inata e adaptativa. [7] Tal corrobora a importância da presença de um microbioma intestinal equilibrado no início da vida, para o desenvolvimento de uma capacidade de resposta adequada do sistema imunitário da criança.

1.1 - Eixo intestino-cérebro

O cérebro e o intestino estão intimamente ligados através do eixo intestino-cérebro, um sistema de comunicação bidirecional que envolve mecanismos neuronais e humorais, que permitem estabelecer conexão entre os centros emocionais e cognitivos no cérebro e a fisiologia intestinal. [20,26] As funções fisiológicas que vão estar em jogo nesta comunicação, que podem sofrer alterações bem como podem ser agentes de mudança são, a nível cerebral, o humor, a cognição, e a nível intestinal, as funções motoras, sensoriais e secretoras (por exemplo, mucina). [27]

As conexões neuronais deste eixo intestino-cérebro fazem-se via sistema nervoso central, sistema nervoso autónomo e sistema nervoso entérico. [20] A componente humoral do eixo intestino-cérebro consiste no eixo hipotálamo-hipófise adrenal, ativado por condições de stresse emocional, o sistema enteroendócrino e o sistema imunitário. [20]

Estudos verificaram uma participação do microbioma intestinal nesta comunicação bidirecional, na medida em que pode ter um papel na função cerebral, bem como os processos iniciados no sistema nervoso central podem interferir com o equilíbrio da flora intestinal. Sinais neuronais ou humorais dos andares superiores do eixo mostraram controlar a função motora, sensorial e secretora do intestino, que influenciam o ambiente intraluminal e induzem estabilidade ou desequilíbrio da flora intestinal. O microbioma mostrou também ter capacidade de regulação da função cerebral, através dos seus metabolitos. Os AGCC ao atingirem o sistema nervoso central permitem a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica e da microglia, pela sua capacidade de contribuir para a expressão dos genes das proteínas das *tight-junctions* [7] e atuam também na supressão do apetite, influenciando o circuito do apetite regulado pelo hipotálamo. [28] Os metabolitos de triptofano produzidos pelo microbiota através do triptofano disponível da dieta, constituem um precursor para a síntese de serotonina pelas células enterocromafins do trato digestivo em resposta a estímulos do sistema nervoso central. A serotonina (5-hidroxitriptamina) é um neurotransmissor que está envolvido no humor, apetite, sono, memória e aprendizagem, e cerca de 90% da quantidade em circulação é de produção intestinal. [18] Vários géneros bacterianos que mostraram ser capazes de produzir determinados neurotransmissores, ainda que possam ser produzidos em pequenas quantidades (Tabela 2). [18]

Tabela 2 - Neurotransmissores produzidos por bactérias pertencentes ao microbioma intestinal

Neurotransmissor	Bactérias produtoras
Acido gama aminobutírico (GABA)	<i>Lactobacillus spp.</i>
	<i>Bifidobacterium spp.</i>
Noradrenalina	<i>Escherichia spp.</i>
	<i>Bacillus spp.</i>
	<i>Sachomyces spp.</i>
Serotonina (5-HT)	<i>Candida spp.</i>
	<i>Streptococcus spp.</i>
	<i>Escherichia spp.</i>
	<i>Enterococcus spp.</i>
Dopamina	<i>Clostridium</i>
	<i>Bacillus spp.</i>
Acetilcolina	<i>Lactobacillus spp.</i>

2 - O microbioma intestinal pediátrico, a atopia e as doenças alérgicas

A atopia é definida como uma tendência hereditária para produzir anticorpos IgE após contacto com antígenos específicos, predispondo a um maior risco de desenvolvimento de doenças alérgicas. [21] Estas doenças caracterizam-se por respostas inapropriadas do sistema imunitário a proteínas inócuas para a população geral, externas ao organismo, os alérgenos. [21,29] Podem surgir, por exemplo, sob a forma de asma, eczema, rinite alérgica e alergia alimentar, apresentando-se isoladas ou combinadas. [21,30]

As doenças alérgicas são consideradas as doenças crónicas mais frequentes nas crianças [31] e a sua etiologia é atribuída a fatores genéticos e ambientais. [30,32] Estando o risco genético para estas doenças já estabelecido, o rápido aumento da sua prevalência na população, predominantemente nos países desenvolvidos, sugere que alterações induzidas pelas exposições ambientais têm uma marcada influência no seu desenvolvimento. Tal é corroborado pelo facto de várias exposições ambientais no início da vida terem sido identificadas como potenciadoras do risco de desenvolvimento de alergias na infância, nomeadamente a alimentação à base de leite de fórmula, parto por cesariana e a exposição a antibióticos, tanto no período pré-natal como após o nascimento. A exposição a animais domésticos com pelo (como o cão e o gato) mostrou conferir proteção, tendo sido descritas menores taxas de alergias em crianças expostas. [10]

O sistema imunitário é a base fisiopatológica destas doenças e é conhecida a influência do microbioma intestinal no desenvolvimento e maturação do sistema imunitário. Existe uma marcada inclinação para respostas T_H2 no sistema imunitário de bebés que desenvolvem doença alérgica. Os indivíduos atópicos apresentam respostas T_H2 exageradas na presença de certos antígenos, incluindo a produção de interleucinas indutoras de IgE e potenciadoras de eosinofilia, IL-3 e IL-4, e IL-5, respetivamente. [29] A ligação das IgE, associadas aos alérgenos, aos mastócitos desencadeia a sua desgranulação com libertação de mediadores inflamatórios, como a histamina. Mediadores citotóxicos dos eosinófilos têm um papel importante numa fase mais tardia da reação alérgica, condicionando uma inflamação crónica. [29] A falha no silenciamento das respostas T_H2 durante a maturação do sistema imunitário está na base do desenvolvimento de alergias, uma vez que o desenvolvimento apropriado das respostas dos linfócitos T reguladores com inclinação para respostas T_H1 são necessárias para se adquirir um fenótipo imunológico mais equilibrado. [29]

As respostas T_H2 exageradas do sistema imunitário dos indivíduos com alergias, mostraram ser controladas pelo butirato, um potente anti-inflamatório capaz de promover a tolerância imunológica, com a diminuição da desgranulação dos basófilos mediada por IgE. [6,31] Cait *et al.* [31] e Macia *et al.* [33] observaram que a flora intestinal de bebés que vieram

a desenvolver doença alérgica, em comparação com as crianças que não desenvolveram doença, apresentava uma depleção na abundância de bactérias com capacidade para a fermentação de hidratos de carbono não digeríveis e uma depleção de genes que codificam para as enzimas intervenientes nessa fermentação, impossibilitando a eficaz produção de butirato.

A literatura recente corrobora a ideia de que o microbiota intestinal pediátrico tem influência no desenvolvimento de doença alérgica, pela variação da quantidade relativa de bactérias entre o microbiota intestinal de crianças saudáveis e o microbiota daquelas que desenvolveram doença (Tabela 3).

Com o objetivo de estudar as diferenças no processo dinâmico de evolução do microbiota intestinal no início da vida e a sua associação com a ocorrência de doença alérgicas, Shen *et al.* [34] recorreram a uma população de bebés (saudáveis ou com doença alérgica), durante o primeiro ano de vida. Verificou-se que as crianças saudáveis demonstraram uma maior variação ao longo do tempo da diversidade alfa (diversidade microbiana dentro de uma só amostra) do seu microbiota intestinal. Entre estes dois grupos de crianças, ao longo de vários marcos temporais, verificaram-se diferenças na abundância relativa dos géneros *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Akkermansia* e *Erysipelatoclostridium*.

2.1 - Asma

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas, desencadeada por sensibilização a alérgenos inalados e caracteriza-se pela tríade: obstrução (reversível) do fluxo aéreo, hiperreatividade brônquica e inflamação do trato respiratório inferior. [21] É a doença crónica mais comum na criança, com grande impacto no seu bem-estar. [29]

Variações na abundância relativa de bactérias do microbiota intestinal foram identificadas nas crianças que desenvolveram asma, face a crianças saudáveis (Tabela 3).

O estudo prospetivo de Stokholm *et al.* [35] comparou a composição do microbioma intestinal no primeiro ano de vida com o diagnóstico de asma aos 5 anos de idade. Constatou-se que as comunidades microbianas do primeiro ano de vida eram significativamente diferentes entre as crianças que aos 5 anos desenvolveram asma e as crianças que se mantiveram saudáveis. O aumento do risco de desenvolvimento de asma foi associado a uma abundância relativa aumentada de *Veillonella* e diminuição de *Roseburia*, *Alistipes* e *Flavonifractor*. Posteriormente, quando agrupadas as crianças em “mãe asmática” e “mãe não asmática”, verificou-se que as diferenças entre o microbiota de crianças saudáveis e doentes foi apenas significativa no grupo das mães asmáticas, o que confere ao microbiota do início

Tabela 3 - Abundância relativa de microrganismos no microbioma intestinal de crianças com doença alérgica comparativamente a crianças saudáveis

	Abundância relativa aumentada no microbioma	Referência	Abundância relativa diminuída no microbioma	Referência
Asma	<i>Veillonella</i>	[35]	<i>Faecalibacterium</i>	[35]
			<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	[32]
			<i>Bifidobacterium</i>	[35]
			<i>Roseburia</i>	[35]
			<i>Alistipes</i>	[35]
			<i>Flavonifractor</i>	[35]
			<i>Ruminococcus</i>	[35]
			<i>Dialister</i>	[35]
			<i>Lachnospiraceae incertae sedis</i>	[35]
			<i>Akkermansia muciniphila</i>	[32]
Eczema	<i>Escherichia</i>	[40]	<i>Bifidobacterium</i>	[40]
	<i>Escherichia coli</i>	[27]	<i>Bifidobacterium longum</i>	[43]
	<i>Shigella</i>	[40]	<i>Megasphaera</i>	[40]
	<i>Veillonella</i>	[40]	<i>Haemophilus</i>	[40]
	<i>Faecalibacterium</i>	[40]	<i>Streptococcus</i>	[40]
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	[40]	<i>Streptococcus salivarius</i>	[40]
	<i>Lacnospiraceae incertae sedis</i>	[40]	<i>Bacteroides</i>	[38]
	<i>Clostridium XIVa</i>	[40]	<i>Bacteroides fragillis</i>	[40,42]
	<i>Clostridium difficile</i>	[42,38]	<i>Lactobacillus spp.</i>	[42]
	<i>Bifidobacterium spp.</i>	[42]	<i>Escherichia coli</i>	[42]
	<i>Ruminococcus gnavus</i>	[40]	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	[42]
	<i>Akkermansia muciniphila</i>	[40]	<i>Ruminococcus gnavus</i>	[41]
		<i>Akkermansia muciniphila</i>	[41]	
		<i>Lachnospiraceae bacterium 2_1_58FAA</i>	[41]	
Sensibilização alimentar	Enterobacteriaceae	[47]	Bacteroidaceae	[47]
			<i>Haemophilus</i>	[44]
			<i>Dialister</i>	[44]
			<i>Dorea</i>	[44]
			<i>Clostridium</i>	[44]
Alergias alimentares			<i>Citrobacter</i>	[44]
			<i>Oscillospira</i>	[44]
			<i>Lactococcus</i>	[44]
			<i>Dorea</i>	[44]

da vida um papel protetor ou despoletador nestas crianças com suscetibilidade genética. Para estes filhos de mães asmáticas, o diagnóstico aos 5 anos mostrou uma associação negativa com a abundância relativa no microbiota, no primeiro ano de vida, de *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Roseburia*, *Alistipes*, *Lachnospiracea incertae sedis*, *Ruminococcus* e *Dialister*, e uma associação positiva com a *Veillonella*. Demirci *et al.* [32] demonstraram também uma variação altamente significativa da abundância de bactérias no intestino das crianças doentes, nomeadamente redução de *Faecalibacterium prausnitzii* e de *Akkermansia muciniphila*, ambas com potencial anti-inflamatório, pela estimulação da produção de citocinas e estimulação de células T reguladoras, respetivamente.

Uma adequada colonização do microbioma intestinal neste período crítico do início da vida pode proteger crianças predispostas ao desenvolvimento de doença, uma vez que os fatores ambientais, neste período, mostraram relacionar-se com o diagnóstico de asma.

No que toca à exposição a antibióticos, Baron *et al.* [30], numa revisão sistemática, debruçaram-se sobre a contribuição da exposição precoce a antibioterapia (pré-natal e pós-natal) para o desenvolvimento de alergias. Relativamente à asma, a grande maioria dos estudos referentes à antibioterapia pré-natal reportaram uma relação significativa e mais de metade dos estudos para exposição pós-natal mostraram também uma significativa associação a esta doença. Num estudo retrospectivo numa população de crianças até aos 10 anos, Ni *et al.* [36] demonstraram que a toma de antibióticos durante e após o primeiro ano de vida tornou as crianças mais propensas à asma, quando comparadas a crianças que não receberam antibioterapia durante este período, e identificou-se também uma relação dose-resposta, na medida em que quanto maior a exposição a esta terapêutica, maior a sua propensão para desenvolver asma na infância. Conclusões semelhantes são apresentadas na revisão de Ihekweazu e Versalovic. [27] Na revisão de Lamont *et al.* [37] faz-se referência a uma associação positiva entre asma na infância e o uso de antibióticos durante a gravidez.

O tipo de parto mostrou também ter influência, na medida em que a cesariana foi reconhecida como fator de risco [35] e, numa meta-análise recente referida no artigo de revisão de Aguilera *et al.* [38], o parto por cesariana aumentou o risco de asma na infância em 20%.

A dieta no início da vida também mostrou influência, pois no estudo de Lee-Sarwar *et al.* [39] a ausência de aleitamento materno exclusivo nos primeiros 4 meses de vida foi associada a um maior risco de asma.

2.2 - Eczema

O eczema, ou dermatite atópica, é uma doença inflamatória crônica, pruriginosa, da pele, associada a hiperreatividade cutânea a *triggers* ambientais, por anormal imunorregulação. [21] Com frequência tem início durante a infância e é tipicamente a primeira manifestação de atopia, uma vez que até 80% das crianças que apresentam eczema, eventualmente desenvolvem rinite alérgica ou asma nos primeiros 5 anos de vida. [40,41]

Perante a existência de diagnóstico de eczema, também se verificou alterações ao nível da flora intestinal, quando comparados com crianças saudáveis, com diferenças ao nível da quantidade relativa de algumas bactérias (Tabela 3).

Zheng *et al.* [40] conduziram um estudo que relaciona a composição bacteriana intestinal com o risco de eczema nos bebés. Verificou-se que os géneros *Bifidobacterium*, *Megasphaera*, *Haemophilus* e *Streptococcus* estavam enriquecidos no microbiota intestinal de bebés saudáveis, enquanto que os géneros *Escherichia* e *Shigella*, *Veillonella*, *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae incertae sedis* e *Clostridium XIVa* se apresentaram em níveis mais elevados nos bebés com eczema. Ao nível da espécie, apresentavam-se em níveis mais elevados nos bebés com eczema, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus gnavus* e *Akkermansia muciniphila*, e, por outro lado, neste grupo eram menos abundantes *Bacteroides fragilis* e *Streptococcus salivarius*, conhecidos pelas suas propriedades anti-inflamatórias. [40]

Melli *et al.* [42], num estudo que englobou crianças em idade escolar, de diferentes estratos sociais, verificaram que a constituição do microbioma intestinal daquelas com eczema era diferente quando comparada com as crianças saudáveis, independentemente da sua condição socioeconómica. Nas crianças com eczema, foram encontradas baixas contagens de *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Methanobrevibacter smithii* e *Lactobacillus spp.* e níveis mais elevados de *Bifidobacterium spp.* A colonização por *Clostridium difficile* foi especialmente associada à condição de eczema. Em concordância, na revisão de Aguilera *et al.* [38] para as crianças que desenvolveram eczema, os resultados recolhidos identificaram uma diversidade diminuída do microbiota, uma redução da diversidade de *Bacteroides* e uma elevada prevalência de *Clostridium difficile*, no primeiro ano de vida.

Lee *et al.* [41] analisaram a composição do microbioma aos 6 meses de idade, de crianças saudáveis e com eczema, identificando-se diferenças em genes relacionados com o desenvolvimento do sistema imunitário. Essas diferenças foram associadas com a depleção de *Ruminococcus gnavus*, *Akkermansia muciniphila* e *Lachnospiraceae bacterium 2_1_58FAA*, na população com eczema. O estudo de Oh *et al.* [43] avaliou também o

conteúdo genético do microbioma intestinal de crianças saudáveis e de crianças com eczema, mas durante o primeiro mês de vida. Verificou-se que os padrões imunomoduladores TCAAGCTTGA apresentavam-se mais abundantes nas crianças saudáveis, estando também presentes nestas crianças comunidades microbianas enriquecidas em funções associadas à biossíntese de tetrapirrol (molécula que participa na via das porfirinas - algumas demonstram efeitos anti-inflamatórios, na via dos corrinóides e no metabolismo da clorofila). Os motivos TCAAGCTTGA estavam particularmente representados no genoma de *Bifidobacterium longum*, cuja população foi encontrada em maior abundância nas crianças saudáveis. [43]

As exposições ambientais no início da vida também demonstraram associação ao eczema. Na revisão de Aguilera *et al.* [38], a antibioterapia nos primeiros anos de vida foi associada ao desenvolvimento de doença. Na revisão de Lamont *et al.* [37], a antibioterapia pré-natal e intraparto estava significativamente associada a eczema na infância, se estes fossem usados durante mais de 24 horas ou se o bebé nascesse por cesariana.

2.3 - Rinite alérgica

A rinite alérgica é uma doença inflamatória crónica da mucosa nasal despoletada pela exposição a alérgenos inalados, para os quais já houve sensibilização, e caracteriza-se por espirros, rinorreia, obstrução nasal, prurido nasal, faríngeo e conjuntival, e lacrimejo. [21]

Os estudos para esta patologia são escassos. No entanto, conseguiu-se identificar alguma influência das exposições ambientais no seu desenvolvimento. Ni *et al.* [36] afirmam que a exposição a antibióticos durante a infância, após o primeiro ano de vida, se relacionou positivamente com o surgimento de rinite alérgica. Na revisão Baron *et al.* [30], os poucos estudos da influência da antibioterapia, também apresentaram evidência da relação entre a antibioterapia no período pós-natal e o desenvolvimento de rinite alérgica na criança.

2.4 - Alergias alimentares

As alergias alimentares, cuja incidência tem vindo a aumentar, [44] são doenças capazes de causar reações anafiláticas *life-threatening* condicionando morbilidade significativa, que prejudica a qualidade de vida da criança. A sua forma mais comum nas crianças é a alergia ao leite de vaca. [45] Geralmente, a hiperreatividade IgE aos alérgenos alimentares, como leite de vaca ou ovo, sofre declínio mais tarde, quando a tolerância a estes alérgenos se desenvolve. [29]

A literatura demonstrou que as bactérias do intestino são importantes para a regulação de respostas alérgicas a antígenos da dieta.

Para compreender de que forma é que a composição da flora comensal do intestino pode ter um papel regulador nas alergias alimentares, Feehley *et al.* [46] procederam à colonização de dois grupos de ratos *germ-free*, um com microrganismos fecais de crianças com alergia às proteínas do leite de vaca e outro com microrganismos fecais de crianças saudáveis. Os ratos colonizados com microbiota de crianças não-alérgicas estavam protegidos contra reações anafiláticas a alérgenos do leite de vaca (β -lactoglobulina), e a sua comunidade microbiana enriquecida com Lachnospiraceae (família da classe *Clostridia*), previamente implicada na proteção contra a sensibilização alérgica aos alimentos. Por outro lado, os ratos colonizados com microbiota de crianças alérgicas mostraram suscetibilidade para respostas anafiláticas. [46]

Savage *et al.* [44], com o objetivo de determinar se a composição da flora intestinal estava associada com a sensibilização (produção de IgE) e com alergias alimentares, avaliaram a sensibilização contra alimentos como o leite, ovo, amendoins, soja, trigo e noz, aos 3 anos de idade. Os géneros *Haemophilus*, *Dialister*, *Dorea*, e *Clostridium* estavam em quantidade inferior naqueles que apresentaram sensibilização alimentar. Os géneros *Citrobacter*, *Oscillospira*, *Lactococcus* e *Dorea* apresentavam-se em quantidade inferior nas crianças com alergia alimentar. Há, também, evidência que sustenta o papel do microbiota do início da vida, na alergia alimentar, na revisão de Stiemsma e Michels [47], onde o aumento da sensibilização alimentar em crianças de um ano de idade foi associado à diminuição da diversidade microbiana, aos 3 meses de idade, e a um rácio Enterobacteriaceae/Bacteroidaceae aumentado, aos 3 e aos 12 meses.

A resolução da alergia ao leite de vaca também foi associada a variações do microbiota intestinal, pois encontrou-se um enriquecimento em *Clostridia* e *Firmicutes* no microbioma dos 3 aos 6 meses de idade de crianças cuja alergia ficou resolvida aos 8 anos. [45]

As alergias alimentares demonstraram também ser influenciadas pelas exposições ambientais do indivíduo. Na revisão de Lamont *et al.* [37] são referidos dois estudos que reportaram que o uso de antibióticos, antes ou durante a gravidez, condicionou risco aumentado de intolerância à lactose na descendência, o que foi menos evidente em crianças que foram amamentadas por períodos mais longos. Aguilera *et al.* [38] reúnem informação que sugere a potencial associação do parto por cesariana e da dieta à base de leite de fórmula às alergias alimentares, pela redução da colonização por *Bifidobacterium*, cuja diminuição das suas espécies, pelos 1-2 meses de idade, aumentou o risco de desenvolver doença por volta dos 5 anos de idade.

3 - O microbioma intestinal pediátrico e as doenças autoimunes

As doenças autoimunes resultam da ativação de linfócitos T e/ou B, associada à sua hiperreatividade, condicionando dano tecidual, uma vez que se trata de uma reação imunológica do organismo contra os seus próprios tecidos. [21] São exemplo destas doenças a diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e a doença celíaca (DC), que na grande maioria dos indivíduos suscetíveis, são diagnosticadas em idade pediátrica, podendo manifestar-se pela primeira vez em qualquer idade. [48,49]

A suscetibilidade para as doenças autoimunes está dependente de um forte controlo genético atribuído à presença de alelos de risco de certos antigénios leucocitários humanos (HLA) classe II, principalmente os genes da região HLA-DR e DQ. [23,50] As moléculas de HLA, na superfície das células apresentadoras de antigénios, ligam-se a antigénios dos ilhéus beta pancreáticos ou a fragmentos específicos de glúten, apresentando-os aos linfócitos T, gerando-se um ambiente pró-inflamatório, que culmina na autodestruição da célula beta pancreática ou do enterócito, respetivamente, despoletando as doenças supracitadas. [21,51]

A suscetibilidade genética do indivíduo constitui um fator de risco para o desenvolvimento destas doenças, no entanto, não será o único, uma vez que mutações nos genes que codificam HLA de suscetibilidade estão presentes numa significativa percentagem da população geral e apenas uma pequena parte desses indivíduos portadores é que acaba por desenvolver doença, mesmo com genótipos de risco. [23,48,52,53] Este facto levanta a hipótese de que fatores de exposição ambiental possam ter um papel preponderante no despoletar destas doenças [53], como vários estudos vieram a comprovar. O diagnóstico de DC foi associado a uma concordância de 70% em gémeos monozigóticos [48] e a DM1, a uma concordância de cerca de 23-47%. [23,54] Identificou-se um surgimento de DM1 em idades cada vez mais precoces em alguns países da Europa e um aumento da prevalência nos genótipos de baixo risco. [55] Também se percecionou um aumento da incidência anual destas doenças nas últimas décadas. [51] Em ambas as doenças, já foi reportada mimetização molecular entre proteínas microbianas e tecidos do hospedeiro, por reatividade cruzada entre peptídeos de HLA e peptídeos de proteínas produzidas por microrganismos, que pode despoletar autoimunidade. [7,21] Tudo isto comprova a influência dos fatores ambientais, indicando que o desenvolvimento de doença autoimune resulta de interação entre os determinantes genéticos do indivíduo e a exposição ambiental no início da vida.

A associação entre variações do microbioma intestinal e o diagnóstico de doenças autoimunes foi estudada, tendo-se identificado discrepâncias entre indivíduos saudáveis e doentes (Tabela 4). A intensidade do risco genético associada ao genótipo HLA de cada indivíduo, parece também explicar as variações no microbioma nas doenças autoimunes, na

medida em que o predomínio, ou não, de certas bactérias na flora intestinal mostrou variação com o risco genético do indivíduo, tendo sido identificadas diferenças na composição do microbioma de crianças com predisposição para estas doenças, entre os diferentes grupos de risco genético. [50,56,57]

Tabela 4 - Abundância relativa de microrganismos no microbioma intestinal de crianças com doença autoimune comparativamente a crianças saudáveis

	Abundância relativa aumentada no microbioma	Referência	Abundância relativa diminuída no microbioma	Referência
Diabetes mellitus tipo 1	Firmicutes	[58]	Bacteroidetes	[58]
	<i>Bacteroides</i>	[49,54]	Firmicutes	[49]
	<i>Clostridium</i>	[49]	<i>Bifidobacterium</i>	[49,54,58]
	<i>Veillonella</i>	[49,54]	<i>Bifidobacterium infantis</i>	[55]
	<i>Ruminococcus</i>	[54]	<i>Prevotella</i>	[49]
	<i>Blautia</i>	[54]	<i>Lactobacillus</i>	[49]
	<i>Enterobacter</i>	[54]	<i>Roseburia</i>	[54]
	<i>Streptococcus</i>	[54]	<i>Faecalibacterium</i>	[54]
			<i>Lachnospira</i>	[54]
Doença celíaca	Firmicutes	[57]	Firmicutes (entre os 4 e os 6 meses)	[63]
	Proteobacteria	[57]	Actinobacteria (incluindo o género <i>Bifidobacterium</i>)	[57]

3.1 - Diabetes *mellitus* tipo 1

A diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição imunomediada das células beta dos ilhéus de *Langerhans* pancreáticos e deficiência de insulina, [21] mediada por linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) autorreativos, produção de anticorpos pelos linfócitos B e ativação do sistema imunitário inato. [7]

A literatura recente permite estabelecer uma associação entre microbioma intestinal e a DM1, na medida em que populações de crianças doentes apresentaram proporções diferentes das bactérias e vírus no microbioma intestinal, comparativamente às crianças saudáveis (Tabela 4).

Traversi *et al.* [58] confirmam que o desenvolvimento de DM1 é modulado por uma composição do microbiota intestinal alterada, verificando-se uma diferença significativa entre o grupo das crianças doentes e o grupo saudável. Níveis elevados de Firmicutes e níveis reduzidos de Bacteroidetes revelaram-se fatores de risco para DM1, neste estudo, enquanto que a colonização por *Bifidobacterium* spp. foi protetora para o despoletar da doença. [58] Na

revisão de Verduci *et al.* [49], a disbiose intestinal no início da vida também foi identificada como *trigger* para a resposta autoimune e o microbiota das crianças com DM1 caracterizava-se por baixa diversidade, reduzida estabilidade, aumento da quantidade de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Veillonella* e redução de Firmicutes, *Prevotella*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Estas diferenças levaram à redução da produção de butirato e lactato, tendo, o primeiro, um papel protetor contra o desenvolvimento de autoimunidade (Tabela 5), pelas suas propriedades anti-inflamatórias, imunomodeladoras e de reforço da barreira intestinal. Verduci *et al.* [49] referem, também, um outro estudo em que nas crianças saudáveis há maior expressão de genes relacionados com a biossíntese de AGCC. Num outro estudo, de Vatanen *et al.* [59], para delinear a evolução natural do microbiota intestinal, no início da vida, colheu-se periodicamente fezes de crianças com suscetibilidade para a DM1 e observou-se, de forma consistente, que bactérias que contribuem para a biossíntese de AGCC estavam em maior quantidade nas crianças saudáveis. Também se identificou um aumento da permeabilidade intestinal e diminuição da diversidade microbiana após a seroconversão, quando já se identificavam autoanticorpos anti-ilhéus, sem que a clínica de DM1 tivesse ainda surgido. [59] O estudo DIABIMMUNE mostrou uma forte correlação inversa da incidência de DM1 e a colonização intestinal por *B. longus* e sugere que uma menor abundância de *Bifidobacterium*, reduzindo a estimulação e regulação saudável do sistema imunitário. [55] Tudo isto sugere que a produção de AGCC será protetora contra o surgimento de DM1.

A mimetização de proteínas do hospedeiro por proteínas produzidas pelo microbiota poderá ser um mecanismo de reatividade cruzada contra as células beta pancreáticas. As integrases, produzidas por *Bacteroidetes*, promovem a produção de linfócitos T CD8⁺ no intestino, mas podem também condicionar dano pancreático durante processos inflamatórios. [7]

No estudo Leiva-Gea *et al.* [54] foram encontradas também alterações no microbiota intestinal de crianças diagnosticadas com DM1. Comparou-se o microbiota de três grupos de crianças: diagnosticadas com DM1, diagnosticadas com MODY2 (forma de diabetes hereditária não autoimune) e saudáveis. Às crianças com DM1 foi associada uma composição diferente dos grupos MODY2 e controlos saudáveis que, comparativamente, apresentava elevada abundância relativa dos géneros *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Veillonella*, *Blautia*, *Enterobacter* e *Streptococcus* e uma abundância diminuída de *Bifidobacterium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* e *Lachnospira*. Os indivíduos com DM1, apresentaram também níveis de lipopolissacarídeos (LPS, componentes principais da membrana externa de bactérias gram-negativas) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) significativamente mais elevados no soro, e uma redução das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-13). A correlação significativa encontrada entre o microbiota intestinal e os níveis séricos de LPS e

determinadas citocinas pró-inflamatórias no hospedeiro justificam a redução da integridade do epitélio da barreira intestinal e a inflamação, facilitando o ataque e dano da célula beta pancreática. [54] As diferenças encontradas entre os indivíduos com DM1 e com MODY2, sugerem a intervenção do microbioma e das citocinas no processo de autoimunidade [54].

Os vírus foram já identificados como potenciais *triggers* para doenças autoimunes [21,60] e estudos recentes mostraram que os vírus que colonizam o intestino tem essa capacidade. As alterações do viroma identificadas ocorreram antes da seroconversão nas crianças suscetíveis, sugerindo que alterações do viroma intestinal podem despoletar essa seroconversão, condicionando posterior surgimento de doença.

A infecção aguda por certos vírus mostrou uma correlação positiva com o desencadear da autoimunidade na DM1, nomeadamente o *Coxsackievirus B4*, conhecido por mediar inflamação pancreática de baixo grau. [23] Também os Enterovírus tipo B e Adenovírus foram associados à autoimunidade, uma vez que, em crianças com suscetibilidade genética para DM1, verificou-se que infecções prolongadas por um destes dois vírus antecederam o início da doença. [23]

Zhao *et al.* [60] definiram o viroma intestinal desde o nascimento até se desenvolver autoimunidade em crianças com risco para DM1, comparando-o ao viroma intestinal de crianças saudáveis. Na população que desenvolveu doença, alterações no viroma precederam a seroconversão. No grupo saudável, o viroma apresentou um enriquecimento em sequências relacionadas com *Circoviridae* e uma maior diversidade e riqueza em bacteriófagos. [60] O papel dos bacteriófagos também foi posto em evidência no estudo de Tetz *et al.* [52], especulando-se que bacteriófagos de *Escherichia coli* possam ter um papel particular no desencadear da autoimunidade na DM1, modulando a população bacteriana e assim condicionando disbiose. Assim, numa população de crianças que desenvolveram DM1, observou-se uma elevação da abundância da *E. coli* no microbiota, à qual se seguiu uma redução dos seus níveis, antes da seroconversão, enquanto que no grupo de crianças saudáveis a abundância de *E. coli* aumentou continuamente, sem qualquer alteração ao longo do tempo. [52]

Uma vez que a disbiose foi identificada nos indivíduos com DM1, Ho *et al.* [61] estudaram se o tratamento com prebióticos conduzia a melhoria clínica em crianças com DM1. Acabou por se concluir que, no grupo de crianças submetido ao prebiótico (insulina enriquecida com oligofrutose), aos 3 meses, os níveis do peptídeo C (molécula produzida no pâncreas em simultâneo com a insulina) eram maiores, fazendo-se acompanhar de melhoria da permeabilidade intestinal. [61] No estudo TEDDY, a administração de probióticos, contendo

Lactobacillus e *Bifidobacterium*, nos primeiros 27 dias de vida, foi associada a uma menor taxa de seroconversão nas crianças com genótipo de risco elevado, HLA DR3 ou DR4. [23,55]

Os vários fatores ambientais aos quais o bebê foi exposto, mostraram conseguir moldar o risco de desenvolvimento de DM1, em alguns estudos. O parto por cesariana, mostrou aumentar em 20% o risco de DM1, em comparação com o parto vaginal. [23,55] Os antibióticos de largo espectro, durante os dois primeiros anos de vida, mostraram estar associados ao aumento da prevalência da doença, em crianças nascidas por cesariana. [23] Kemppainen *et al.* [62] mencionam estudos prévios onde não se encontra qualquer associação significativa entre a exposição a antibióticos durante a gravidez ou na primeira semana de vida e o aumento do risco do desenvolver DM1. Relativamente à dieta no início da vida, verificou-se que o risco de doença duplicou nas crianças que não foram alimentadas com leite materno, face às crianças amamentadas. [49] A duração dessa amamentação não influenciou o risco. [49] Verduci *et al.* [49], no seu artigo de revisão, mencionam também uma meta-análise, que revela que em pacientes com DM1, o aleitamento materno exclusivo por mais de 2 semanas está associado com a redução no risco de diabetes em 15%.

3.2 - Doença celíaca

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia desencadeada pela ingestão de glúten na dieta, em indivíduos suscetíveis. Essa ingestão desencadeia uma resposta imunitária local aberrante contra o tecido intestinal, com lesão dos enterócitos, como resposta a uma intolerância às proteínas do glúten (gliadina), sendo por isso uma causa de má absorção. [21,53,56]

Para se compreender a importância da disbiose para a DC, vários estudos foram conduzidos em crianças com suscetibilidade genética para esta doença. Fatores capazes de danificar a barreira intestinal, como a disbiose, permitem que macromoléculas (por exemplo, glúten não totalmente digerido) atravessem facilmente a mucosa e se liguem a células apresentadoras de antígenos HLA II levando à ativação de linfócitos T CD4⁺ e secreção de citocinas, gerando-se um ambiente pró-inflamatório com dano tecidual da parede intestinal. [53] Quando no intestino delgado ocorre uma digestão parcial do glúten em peptídeos com mais de 10 aminoácidos, tal predispõe a um aumento da sua imunogenicidade, principalmente se englobar a porção 33-mer (peptídeo de gliadina reconhecido por ser dos mais imunogénicos). [53]

A literatura recente permite associar o microbiota intestinal à DC, uma vez que, quando comparado entre crianças doentes e crianças saudáveis, foram identificadas marcadas diferenças entre eles, em termos de proporção dos níveis das diferentes bactérias colonizadoras do intestino (Tabela 4).

As bactérias comensais do intestino, principalmente os *Lactobacillus*, secretam peptidases capazes de degradar os peptídeos de glúten, modificando o seu potencial imunogénico. Na revisão de Chibbar e Dieleman [53], é referido que o glúten pode ser metabolizado por 144 estirpes de 35 espécies bacterianas, várias pertencentes aos filos Firmicutes e Actinobacteria, que mostraram proteção contra a DC. Também se menciona um estudo que isolou estirpes bacterianas que degradam glúten no intestino delgado e *Lactobacillus* foi o género mais representado, sugerindo o seu papel protetor através da digestão do glúten e diminuição da imunogenicidade dos peptídeos 33-mer. [53] A disbiose, ao condicionar fragilidade das *tight-junctions* da barreira intestinal, facilita a entrada de péptidos de gliadina parcialmente digeridos para a lâmina própria. Nos pacientes com DC, a perda de tolerância ao glúten está associada com a ativação de células T CD4⁺ específicas do glúten na lâmina própria e aumento da produção de IL-5, uma citocina pró-inflamatória [53]

Olivares *et al.* [63], num estudo prospetivo que incluiu recém-nascidos saudáveis com pelo menos um familiar em primeiro grau com DC, observaram que o microbioma intestinal das crianças que não desenvolveram doença, após 5 anos de follow-up, sofreu aumento significativo da diversidade bacteriana entre os 4 e os 6 meses de vida, com aumento marcado da proporção de Firmicutes. As crianças que desenvolveram doença, já aos 4 meses apresentavam grande diversidade do microbioma. [63]

Os fatores ambientais aos quais o bebé é exposto no início da vida mostraram também associar-se ao diagnóstico de DC. A antibioterapia no primeiro ano de vida foi associada ao aumento do risco de desenvolver DC, bem como ao início mais precoce da doença, numa relação que se revelou dose-dependente, [48,53] associando-se especialmente à toma de cefalosporinas. [53] O tratamento antibiótico durante a gravidez não se associou ao aumento do risco de DC. [62] Relativamente ao tipo de parto, uma aumento da prevalência de DC foi identificado nas crianças nascidas por cesariana. [53,57] As crianças com génotipos de risco (HLA-DQ2 ou DQ8), quando alimentados à base de leite materno, apresentaram proteção contra o desenvolvimento de DC. [53] Esse mesmo génotipo e uma alimentação no início da vida à base de leite de fórmula foram ligados a um maior risco de doença. [56] Olivares *et al.* [56] descobriram que, em bebés com pelo menos um familiar em primeiro grau com DC, a colonização por bactérias patogénicas está especialmente associada à alimentação à base de leite de fórmula (*Clostridium perfringens* e *C. difficile*), e associada ao génotipo de alto risco (*Escherichia coli* enterotoxigénica), predispondo a um ambiente intestinal pró-inflamatório. O génotipo de alto risco HLA-DQ2 associou-se a proporções aumentadas de Firmicutes e Proteobacteria e níveis reduzidos de Actinobacteria (incluindo o género *Bifidobacterium*). [57]

Tabela 5 - Fatores protetores e não-protetores para a autoimunidade. Baseada em informação retirada de: *Harrison's Principles of Internal Medicine* [21]

Fatores protetores	Fatores não protetores	
	<i>Exógenos</i>	<i>Endógenos</i>
<ul style="list-style-type: none"> — Sequestro de auto-antígenos, tornando-os inacessíveis aos sistema imunitário; — Geração e manutenção de tolerância imunológica, com o controlo da atividade dos linfócitos autorreativos; — Regulação da resposta imunológica, com limitação do seu potencial reativo, através de: <ul style="list-style-type: none"> • Linfócitos T e B reguladores; • Citocinas reguladoras; • Células mesenquimatosas reguladoras. 	<ul style="list-style-type: none"> — Reatividade cruzada entre proteínas microbianas e auto-antígenos, ativando linfócitos autoreativos; — Estimulação de linfócitos T e B por superantígenos (péptidos microbianos capazes de ativar o sistema imunitário: proteína estafilocócica A e enterotoxina estafilocócica); — Dano tecidual mediado por microrganismos. 	<ul style="list-style-type: none"> — Perturbações na apresentação de antígenos; — Aumento da função dos linfócitos T auxiliares; — Aumento da função de linfócitos B; — Defeitos na apoptose ou <i>clearance</i> de material apoptótico; — Desequilíbrio de citocinas; — Alteração na imunorregulação, por defeitos na atividade dos linfócitos T reguladores.

4 - O microbioma intestinal pediátrico e as doenças metabólicas

4.1 - Obesidade

A obesidade é uma doença metabólica que se caracteriza pelo excesso de tecido adiposo no organismo, [21] que constitui um problema de saúde pública à escala mundial. A sua prevalência está a aumentar nas crianças e adolescentes e é um fator de risco para síndrome metabólico, diabetes *mellitus* tipo 2, doença cardiovascular e cancro. [27,64-67]

A predisposição genética, a dieta e o estilo de vida sedentário são fatores de risco determinantes para o desenvolvimento de obesidade infantil. Também o excesso de peso ou obesidade materna na gravidez, o parto por cesariana, a dieta à base de leite de fórmula, a terapêutica antibiótica (*in utero* ou após o nascimento), a exposição tabágica durante a gravidez e os baixos níveis de escolaridade maternos, mostraram uma associação com o desenvolvimento de obesidade infantil. [65] Alguns destes fatores são conhecidos por moldar a composição do microbioma intestinal, influenciando a sua capacidade de degradação e metabolização de alimentos, de recolha de energia e de regulação do metabolismo do hospedeiro. [65,66,68]

Os resultados de estudos recentes permitem estabelecer a existência de associação entre a composição do microbiota intestinal e a obesidade infantil (Tabela 6). No entanto, alguns desses estudos não conseguiram clarificar se essas alterações no microbiota estabelecem uma relação causal direta com a obesidade ou se se trata apenas de uma consequência da dieta hipercalórica da criança. [24,67]

Riva *et al.* [67] caracterizaram o microbiota intestinal de crianças entre os 6 e os 16 anos de idade, organizadas em 2 grupos (peso normal e obesidade), verificando-se claras diferenças entre a composição do microbiota intestinal e os níveis de AGCC nestes dois grupos. Nas crianças obesas o rácio Firmicutes/Bacteroidetes estava aumentado, bem como a concentração de AGCC nas fezes, sugerindo elevada atividade de fermentação no intestino, com utilização aumentada dos substratos alimentares, relacionando-se positivamente com os valores do índice da massa corporal (IMC) da criança. Gallardo-Becera *et al.* [24] também encontraram um aumento do rácio Firmicutes/Bacteroidetes nas crianças obesas. Este estudo agrupou crianças em 3 categorias (peso normal, obesidade e obesidade com síndrome metabólico). As crianças obesas, com ou sem síndrome metabólico, exibiram uma maior riqueza e diversidade da flora intestinal e Firmicutes marcadamente aumentados, comparativamente às crianças de peso normal, nas quais os Bacteroidetes se apresentaram em maior abundância. Os resultados deste estudo sugerem o género *Collinsella* e a espécie *Collinsella aerofaciens* como potenciais biomarcadores de obesidade com síndrome

metabólico e o gênero *Porphyromonas* e, em particular, uma espécie indeterminada, pertencente ao mesmo gênero, como biomarcador de obesidade sem síndrome metabólico, na população estudada. [24]

Tabela 6 - Abundância relativa de microrganismos no microbioma intestinal de crianças com doença metabólica comparativamente a crianças saudáveis

	Abundância relativa aumentada no microbioma	Referência	Abundância relativa diminuída no microbioma	Referência
Obesidade	Firmicutes	[24,67,76]	Bacteroidetes	[24,67]
	Porphyromonas	[24]	<i>Parabacteroidetes</i>	[65]
	<i>Dorea</i>	[65]	<i>Peptostreptococcae U.</i>	[65]
NAFLD	Bacteroidetes	[76]	Ruminococcaceae	[66]
	Proteobacteria	[76]	<i>Alistipes</i>	[66]
	<i>Escherichia</i>	[66,78]	<i>Prevotella</i>	[66]
	<i>Anaerobacter</i>	[66]	<i>Coprococcus</i>	[78]
	<i>Streptococcus</i>	[66]		
	<i>Lactobacillus</i>	[66,78]		
	<i>Oscillibacter</i>	[76]		
	<i>Lactonifactor</i>	[76]		
	<i>Akkermansia</i>	[76]		
	<i>Enterococcus</i>	[76]		
NASH	<i>Ruminococcus</i>	[79]	<i>Faecalibacterium</i>	[78]
	<i>Lactobacillus</i>	[76]	<i>Ruminococcus</i>	[78]
	<i>Oribacterium</i>	[76]		
Cirrose hepática	<i>Bacteroides</i>	[78]		
	<i>Escherichia</i>	[78]		
	<i>Prevotella copri</i>	[76]		

Mbakwa *et al.* [68] e Gao *et al.* [69] estudaram o microbiota intestinal na idade escolar. Várias bactérias mostraram estar associadas com o peso das crianças, tendo, em ambos os estudos, se verificado diferenças da abundância de várias espécies bacterianas entre os grupos de crianças de peso normal e peso aumentado. No entanto, o rácio Bacteroidetes/Firmicutes não demonstrou uma associação significativa com o peso da criança, ao contrário dos estudos acima mencionados.

Cortés-Martín *et al.* [70] avaliaram as probabilidades de excesso de peso ou obesidade em crianças e adolescentes, tendo em conta as variáveis: etnia, idade, sexo, dieta mediterrânea, atividade física, metabolitos de urolitina (biomarcadores do microbioma intestinal), suscetibilidade genética (por polimorfismos de genes relacionados com obesidade)

e doenças cardiometabólicas. Concluiu-se que o microbiota intestinal contribuiu para a fisiopatologia da obesidade infantil, como resultado de uma associação entre os vários fatores ambientais e a suscetibilidade genética. [70]

O padrão de colonização do microbiota intestinal no início da vida mostrou um efeito a longo prazo. No estudo prospectivo de Stanislowski *et al.* [64], foi examinado o microbiota intestinal pediátrico, em 6 pontos temporais, durante os primeiros 2 anos de vida. Particularmente aos 2 anos, a composição do microbiota demonstrou estar associada com os valores de IMC dessas crianças aos 12 anos de idade, apesar de, aos 2 anos, as crianças que vieram a desenvolver excesso de peso e obesidade, ainda não apresentarem valores de IMC alterados. Assim, o padrão do microbiota que influenciou o aumento do peso na criança já estava presente antes das alterações de peso. Microrganismos do género *Bacteroides* foram identificados como preditores do IMC, nos marcos de 1 e 2 anos de idade. [64] Num estudo de Karvonen *et al.* [65], analisou-se a composição do microbiota intestinal aos 3 anos de idade, e algumas das diferenças na composição bacteriana que tipicamente se verificam entre adultos obesos e não-obesos, já se observavam nessas crianças. Isto sugere que alterações no microbiota intestinal que predispõem à obesidade no adulto poderão ter origem na infância.

As exposições ambientais no início da vida demonstraram influenciar a composição do microbiota intestinal, e assim promover o desenvolvimento de obesidade infantil. A exposição da criança à antibioterapia mostrou ter influência no seu peso. Zhang *et al.* [71] compararam os bebés expostos a antibioterapia pré-natal aos bebés não expostos e verificaram que os primeiros apresentaram um IMC aumentado aos 12 meses de idade. Identificou-se uma associação dependente da dose, com valores crescentes de IMC, para números maiores de ciclos de antibióticos realizados. Chelimo *et al.* [72] concluíram que uma exposição repetida aos antibióticos nos primeiros quatro anos de vida estava associada a um IMC aumentado e uma maior probabilidade de obesidade aos quatro anos e meio de idade. A exposição repetida durante a gravidez também foi associada a um IMC elevado na descendência. [72] Em contraste, Karvonen *et al.* [65] não reportou relação da obesidade infantil com o número de ciclos de antibióticos realizados desde o nascimento ou com a exposição durante o parto. Quanto ao tipo de parto, Lavin e Preen [73] reportaram um aumento da probabilidade de excesso de peso e obesidade nas crianças nascidas por cesariana. Karvonen *et al.* [65] não reconheceram o parto por cesariana como fator de risco para a obesidade, no entanto, a obesidade materna, o peso e comprimento ao nascimento e uma dieta à base de leite de fórmula, no primeiro ano de vida, foram associados ao risco de excesso de peso e obesidade infantil.

4.2 - Doença do fígado gordo não alcoólica

À obesidade associa-se um risco aumentado de doença do fígado gordo não alcoólica (NAFLD), acumulação de lípidos no hepatócito, que afeta pelo menos 30% das crianças obesas. [74] É a causa mais comum de doença hepática crónica em várias áreas geográficas e pode causar alterações histológicas que variam desde a simples esteatose até um estágio de inflamação progressiva e crónica, a esteato-hepatite não alcoólica (NASH), caracterizada pela presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias que promovem a infiltração celular inflamatória e eventualmente fibrose/cirrose. [66,75]

Estudos recentes permitem a confirmação que o microbiota intestinal está relacionado com o desenvolvimento e progressão de NAFLD (Tabela 6). Tal como foi percebido para a obesidade, é plausível que existam várias floras intestinais com potencial patogénico para cada um dos hospedeiros, dependendo da exposição ambiental do mesmo. [69,76-78]

Tanto estudos em animais como em humanos mostram que o microbioma intestinal está envolvido na patogénese de NAFLD, através do metabolismo dos lípidos e colesterol, armazenamento de triglicéridos, inflamação hepática e regulação da lipogénese e gliconeogénese. A dieta pode também ter um papel na NAFLD, tanto diretamente como indiretamente, através da fermentação da fibra alimentar pelo microbioma intestinal, com produção de AGCC, atuando no aproveitamento da energia dos alimentos, na expansão do tecido adiposo e na gliconeogénese no fígado. [66,75] A produção anormal destes metabolitos, condicionado pela disbiose, permite uma fácil absorção de bactérias e toxinas para a circulação portal em direção ao fígado, fazendo com que este esteja continuamente em contacto com estas moléculas nocivas que induzem dano hepático. A isto está subjacente uma ativação de diferentes vias de sinalização, gerando-se inflamação e stresse oxidativo, pela estimulação das células de Kupffer a produzir citocinas pró-inflamatórias. [66] Todo isto consegue induzir esteatose hepática e evolução para esteatohepatite. [79] Também se sabe que o microbioma intestinal tem uma participação importante na modulação da homeostase dos ácidos biliares, na NAFLD, ainda que não totalmente compreendido. [75]

Num artigo de revisão, Altamirano-Barrera *et al.* [66] fazem referência a uma abundância relativa aumentada de *Lentisphaerae*, ao nível do filo, e *Escherichia*, *Anaerobacter*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, ao nível do género, nos doentes com NAFLD, em comparação com os controlos saudáveis. Por outro lado, *Ruminococcaceae* e os géneros *Alistipes* e *Prevotella* mostraram um aumento significativo da sua abundância no microbiota do intestino de pacientes saudáveis. O sobrecrecimento bacteriano no intestino delgado, identificado em indivíduos obesos, mostrou acelerar a progressão de NAFLD a NASH. [66] A

revisão de Sharpton *et al.* [78] reuniu informação coincidente com o estudo anterior, identificando o aumento dos níveis de *Escherichia* e *Lactobacillus* e uma diminuição de *Coprococcus* como um achado comum nos pacientes com NAFLD, no entanto foram referidos resultados contraditórios relativamente à abundância de *Ruminococcus*, *Prevotella* e *Bifidobacterium*. Na fase NASH da doença, estudos mostraram que os doentes apresentavam uma abundância diminuída de *Faecalibacterium* e *Ruminococcus*, enquanto que num outro estudo, *Ruminococcus* apresentavam uma abundância relativa aumentada. [78] Foi identificada uma associação entre *Bacteroides* e *Escherichia* ao estado de fibrose avançada. [78]

Stanislowski *et al.* [75] estudaram a intervenção da flora intestinal na fisiopatologia de NAFLD, investigando a relação entre o microbioma intestinal, a dieta e a fração de gordura hepática em adolescentes. Bactérias do microbiota intestinal mostraram um importante valor preditivo da fração de gordura hepática e identificou-se uma baixa diversidade alfa para maiores níveis de gordura hepática. Alguns microrganismos associados com o fígado gordo estão altamente associados com os ácidos biliares. [75] Um exemplo é a correlação positiva encontrada, neste estudo, entre a abundância de *Bilophila* e a elevada fração de gordura hepática, mas apenas perante níveis baixos de *Oscillospira*, que se revelou negativamente associada a maiores níveis de gordura hepática. Níveis elevados de gordura hepática foram observados perante uma maior ou menor abundância de *Bacteroides*, enquanto que uma fração de gordura hepática moderada associou-se a uma abundância moderada. [75]

Schwimmer *et al.* [76] analisaram o microbioma intestinal de crianças obesas, com e sem NAFLD. Níveis fecais elevados de genes bacterianos reguladores da síntese de metabolitos microbianos pró-inflamatórios (LPS) e da montagem flagelar estavam associados à severidade da doença e permitiram identificar crianças com esteato-hepatite e fibrose moderada a severa, associada à elevação de *Prevotella copri*. Bacteroidetes e Proteobacteria estavam mais elevados na NAFLD, enquanto que Firmicutes estavam aumentados nas crianças obesas sem NAFLD. Ao nível do género taxonómico, *Oscillibacter*, *Lactonifactor*, *Akkermansia*, e *Enterococcus* estavam elevados nos pacientes com NAFLD e *Lactobacillus* e *Oribacterium* estavam aumentados na NASH. [76]

Partindo do princípio de que a obesidade materna se associa com o risco aumentado de obesidade e NAFLD na descendência, Soderborg *et al.* [74] compararam ratos *germ-free* colonizados com a flora intestinal de bebés de 2 meses de idade nascidos de mães obesas ou de mães de peso normal. Os ratos colonizados com flora intestinal de filhos de mães obesas demonstraram uma expressão aumentada de genes hepáticos para o stresse do retículo endoplasmático e imunidade inata, com sinais histológicos de inflamação periportal

(padrão histológico reportado frequentemente nos casos pediátricos de NAFLD). Nesses mesmos ratos, a exposição a uma dieta ocidental promoveu ganho de peso e surgimento de NAFLD. [74] Este estudo demonstra que perturbações na composição do microbioma do início da vida contribuem para aumento da permeabilidade intestinal, redução da atividade fagocítica dos macrófagos e translocação bacteriana para o fígado, resultando num aumento da inflamação hepática, aparecimento de NAFLD e aumento de peso, como percebido nos animais alvos do estudo. [74]

5 - O microbioma intestinal pediátrico e o cérebro

O desenvolvimento cerebral é um processo que tem início *in utero* e continua pelo menos até ao final da adolescência. [80] Nos primeiros anos de vida ocorrem rápidas mudanças na estrutura e função cerebral, com desenvolvimento das dendrites e axónios, seguido da mielinização, da formação de novas sinapses e desenvolvimento das células da glia. [80] Trata-se de um processo que depende da interação entre a genética e os fatores ambientais. A epigenética, através da qual os fatores ambientais são capazes de regular a expressão génica, é responsável por uma programação de efeito duradouro com papel no desenvolvimento cerebral e no comportamento da criança. [28,80]

Com a descoberta do eixo intestino-cérebro e a perceção da interação bidirecional entre a flora intestinal e o sistema nervoso central, possibilitou-se a perceção da possível intervenção do microbioma intestinal neste eixo. Foi sugerida a importância do microbioma intestinal na regulação da sinaptogénese, nomeadamente ao nível da expressão das proteínas sinaptofisina e PSD-95, em estudos com ratos *germ-free*, [80] sugerindo que a disbiose têm efeitos negativos a esse nível, comprometendo o correto desenvolvimento cerebral. Por outro lado, perturbações no sistema nervoso central e variações emocionais (como o stress e a depressão) podem também ser agentes de perturbação da composição do microbioma intestinal. [81]

Na literatura há evidências que sugerem que o desequilíbrio do comportamento infantil está associado à presença de discrepâncias da abundância relativa de bactérias da flora intestinal, face a crianças saudáveis (Tabela 7).

O padrão de colonização do microbioma intestinal mostrou relacionar-se com os fatores ambientais aos quais a criança é exposta no início da vida (contexto socioeconómico, stress dos cuidadores e a relação estabelecida com estes) e com os seus padrões de comportamento, como verificado por Flannery *et al.* [82]. Numa população com idades entre os cinco e os sete anos, *Bacteroides fragilis* estava associado a redução de comportamentos agressivos, de reatividade emocional, de tristeza, de impulsividade e a conflitos familiares menos frequentes. [82] *B. thetaiotaomicron* mostrou relação com a diminuição de padrões de ansiedade, de depressão e de agressividade. [82] Bactérias produtoras de butirato mostraram também ter influência: *Coprococcus comes* (associação positiva com o transtorno misto de ansiedade e depressão), *Eubacterium rectale* (associação positiva com a redução do controlo inibitório) e *Roseburia inulinivorans* (associação positiva à diminuição de patologia depressiva). [82]

Tabela 7 - Abundância relativa de microrganismos no microbioma intestinal de crianças com doença por alteração do eixo intestino-cérebro comparativamente a crianças saudáveis

	Abundância relativa aumentada no microbioma	Referência	Abundância relativa diminuída no microbioma	Referência
DEA	Actinobacteria	[86,90]	<i>Flavonifractor</i>	[87]
	Proteobacteria	[90,92]	<i>Lachnoclostridium</i>	[87]
	Bacteroidetes	[86]	<i>Tyzzarella</i> (subgrupo 4)	[87]
	Firmicutes	[86]	<i>Coprococcus</i>	[86]
	<i>Bacillus</i>	[90]	<i>Bifidobacterium</i>	[86,93]
	<i>Bifidobacterium</i>	[90]	<i>Prevotella</i>	[92]
	<i>Butyrivibrio</i>	[90]	<i>Ruminococcus</i>	[92]
	<i>Enterococcus</i>	[90]		
	<i>Hespellia</i>	[90]		
	<i>Prevotella</i>	[90]		
	<i>Clostridium</i>	[86,92]		
	<i>Clostridium clostridioforme</i>	[87]		
	<i>Clostridium bolteae</i>	[90]		
	<i>Clostridium difficile</i>	[90]		
	<i>Bacteroides</i>	[86,93]		
	<i>Parabacteroides</i>	[86]		
	<i>Faecalibacterium</i>	[86]		
	<i>Phascolarctobacterium</i>	[86]		
	<i>Streptococcus</i>	[92]		
	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	[92]		
	<i>Haemophilus</i>	[92]		
	<i>Wautersiella</i>	[92]		
	<i>Ruminococcus</i>	[93]		
	<i>Ruminococcus torques</i>	[94]		
	<i>Flavonifractor plautii</i>	[94]		
	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	[94]		
<i>Eubacterium dolichum</i>	[94]			
<i>Bacterium_6_1_63FAA</i>	[94]			
PHDA	<i>Clostridiales_g</i>	[96]	<i>Haemophilus</i>	[96]
	<i>Family_XIII_AD3011_group</i>	[96]		
	<i>Ruminiclostridium_9</i>	[96]		
	<i>Ruminococcaceae_NK4A214_group</i>	[96]		
	<i>Ruminococcaceae_UCG_003</i>	[96]		
	<i>Ruminococcaceae_UCG_004</i>	[96]		
	<i>Ruminococcaceae_UCG_005</i>	[96]		
	<i>Ruminococcaceae_g_uncultured</i>	[96]		
	<i>Ruminococcus_2</i>	[96]		
SII	<i>Veillonella</i>	[22]	<i>Bifidobacterium</i>	[22]
	<i>Prevotella</i>	[22]	<i>Verrucomicrobium</i>	[22]
	<i>Lactobacillus</i>	[22]		
	<i>Parasporobacterium</i>	[22]		
	<i>Haemophilus parainfluenza</i>	[100]		

Loughman *et al.* [83], reportaram uma associação clara entre a diminuição da abundância relativa do gênero *Prevotella* aos 12 meses de idade e um maior risco de desenvolvimento de alterações comportamentais aos 2 anos. A exposição recente à antibioterapia, antes da colheita da amostra fecal, foi considerada o principal preditor da redução desses níveis. Pensa-se que este gênero é capaz de influenciar o desenvolvimento cerebral e o comportamento através do nervo vago, da libertação de citocinas e enzimas, do metabolismo do triptofano, de interação com o sistema imunitário periférico, de efeitos no fator neurotrófico derivado do cérebro e também na produção de AGCC. [83] O temperamento aos 6 meses foi também associado à composição do microbiota no início da vida, num estudo de Aatsinki *et al.* [84]. Estudou-se o microbioma intestinal de crianças com 2,5 meses de idade e, aos 6 meses, avaliou-se o seu padrão de temperamento. Um traço de maior extroversão, autorregulação e melhores competências sociais mostrou estar associado a maior abundância relativa de *Bifidobacterium* e *Streptococcus* e a uma menor abundância de *Atopobium*. Por outro lado, nos bebés que apresentaram maior reatividade ao medo e traços emocionais negativos, com risco de evolução para patologia psiquiátrica, verificou-se uma associação positiva com os géneros *Erwinia*, *Rothia* e *Serratia*. [84]

Infeções intestinais mostraram capacidade de induzir propensão a doenças psiquiátricas. Ramírez-Carrillo *et al.* [81] estudaram a interação entre o microbiota intestinal e a infeção por parasitas *Ascaris lumbricoides*, um helminta presente no solo, em comunidades indígenas (adultos e crianças). Observou-se que a presença deste parasita perturbou a rede de interações dos constituintes do microbiota intestinal, afetando os géneros *Coprococcus* e *Dialister* (géneros cuja ausência foi fortemente associada à depressão), perturbando as suas interações fisiológicas. [81]

5.1 - Doenças do neurodesenvolvimento

As doenças no neurodesenvolvimento são condições que interferem com o normal desenvolvimento das crianças, perturbando a aquisição de competências básicas durante a infância. Neste grupo de doenças inserem-se as doenças do espectro do autismo (DEA) e perturbação de hiperatividade e défice de atenção (PHDA).

Numa abordagem geral às doenças do neurodesenvolvimento, no estudo de Sordillo *et al.* [85], a composição do microbiota intestinal entre os 3 e os 6 meses de idade mostrou-se alterada na perturbação de aquisições de competências como a motricidade fina e comunicação, aos 3 anos. Um predomínio da ordem taxonómica Clostridiales (género *Lachnospiraceae* e outro não classificado) e redução da abundância de *Bacteroides*, relacionaram-se com baixas aptidões de comunicação, e a preponderância de *Bacteroides* foi associada a baixas pontuações de motricidade fina. [85]

5.1.1 - Doenças do espectro do autismo

As doenças do espectro do autismo (DEA) são doenças do neurodesenvolvimento, complexas e heterogêneas, que se manifestam por dificuldade na interação social e na comunicação verbal e não verbal, e por comportamentos repetitivos. [21] Estas crianças tendem a apresentar comorbilidades, como atraso intelectual, perturbações gastrointestinais (dor abdominal, obstipação, diarreia e flatulência) e perturbações alimentares e do sono. [86-88] As DEA são tipicamente diagnosticadas numa fase precoce do desenvolvimento da criança e a sua incidência aumentou nos últimos anos. [26,89] Em parte, este aumento pode ser devido à maior consciência da doença por parte dos profissionais de saúde e de educação. [86]

A etiologia das DEA não está totalmente estabelecida e a evidência científica sugere que tanto fatores genéticos como ambientais estão envolvidos. [87] Foi identificada hereditabilidade significativa, uma vez que irmãos nascidos em famílias com DEA têm um risco aumentado em 50%, gémeos monozigóticos mostraram uma concordância de 60-90%, enquanto que nos dizigóticos a taxa de concordância está nos 10%. [21,26] A relação entre fatores ambientais e um maior risco de desenvolvimento desta doença foi observada nos casos de crianças que nasceram pré-termo com baixo peso, que nasceram por cesariana, que não foram amamentadas, que passaram por hospitalização prolongada, que receberam tratamento antibiótico prolongado ou em que a mãe sofreu infeção durante a gravidez. [86,89]

A existência de problemas gastrointestinais concomitantes nestas crianças é cerca de quatro vezes superior à população geral, direcionando os estudos para a pesquisa de uma possível relação entre as DEA e a flora intestinal. [26,89] Estudos recentes demonstraram que crianças diagnosticadas com DEA apresentam uma composição do microbioma intestinal alterada face às crianças com padrão de desenvolvimento normal (Tabela 7).

Ma *et al.* [87] compararam a composição do microbioma intestinal de crianças diagnosticadas com DEA e crianças saudáveis, verificando-se que, no grupo dos doentes, encontraram-se menores valores populacionais da família Acidamonococcaceae e dos géneros *Flavonifractor*, *Lachnoclostridium*, *Tyzzarella* (subgrupo 4) e de um não identificado pertencente a *Lachnospiraceae*, e uma proporção aumentada de *Clostridium clostridioforme*. [87] Plaza-Díaz *et al.* [90], numa população entre os 2 e os 6 anos de idade, identificaram nas crianças com DEA, comparativamente às saudáveis, diferenças ao nível dos filos Actinobacteria e Proteobacteria, que se encontravam significativamente mais elevados neste grupo. Ao nível do género e da espécie, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Enterococcus*, *Hespellia*, *Prevotella*, *Clostridium bolteae* e *Clostridium difficile* estavam particularmente mais elevados também nas crianças doentes. [90] Sun *et al.* [91] constataram

que, no microbioma de crianças com DEA, ao nível da classe, a abundância relativa de Bacteroidales e Selenomonadales estava reduzida e ao nível da ordem, *Prevotellaceae* estava mais baixa e a abundância relativa de *Ruminococcus* apresentou-se elevada, face às crianças saudáveis. Num artigo de revisão com metanálise, Iglesias-Vázquez *et al.* [86] identificaram disbiose no microbiota intestinal de crianças com DEA, quando comparadas a crianças saudáveis, nomeadamente, ao nível do filo, níveis mais elevados de Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria, e ao nível do género, abundância relativa aumentada de *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* e *Phascolarctobacterium* e abundância relativa diminuída de *Coprococcus* e *Bifidobacterium*. [86]

O microbioma intestinal das mães com filhos diagnosticados com DEA apresentou também diferenças significativas quando comparado ao microbioma de mães de crianças saudáveis. Li *et al.* [92] realizaram um estudo para identificar diferenças do microbioma entre as crianças, mas também entre o microbioma das suas mães. Face às crianças com desenvolvimento normal, aquelas com diagnóstico de DEA apresentaram uma abundância relativa aumentada dos géneros *Clostridium* e *Streptococcus*, de *Alcaligenaceae*, de *Parabacteroides johnsonii* e de espécies pertencentes a *Proteobacteria*, enquanto que espécies de *Prevotella* e *Ruminococcus* se encontravam em níveis reduzidos nestas crianças. As mães de filhos com DEA, apresentaram no seu microbiota maiores níveis de Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Moraxellaceae e Acinetobacter, tal como os seus filhos. No entanto, estas crianças apresentaram biomarcadores únicos: níveis aumentados de *Alcaligenaceae*, *Clostridium*, *Haemophilus* e *Wautersiella* e níveis diminuídos de *Ruminococcaceae* e *Paraprevotellaceae*. [92]

Ahmed *et al.* [93] estudaram as variações na composição do microbioma entre crianças com autismo, os seus irmãos saudáveis e crianças saudáveis não-familiares. A composição do microbioma intestinal das crianças doentes revelou-se marcadamente diferente da composição do microbiota dos controlos saudáveis e, por outro lado, muito semelhante à do grupo dos seus irmãos saudáveis. O microbioma das crianças com DEA e dos seus irmãos continha uma abundância relativa mais elevada de *Bacteroides* e de *Ruminococcus* e os rácios *Prevotella/Bacteroides* e Firmicutes/Bacteroidetes estavam significativamente mais baixos. Estes dois grupos diferiram apenas nos níveis de *Bifidobacterium*, que se apresentavam significativamente mais elevados no grupo dos irmãos saudáveis. Neste estudo, tentou-se estabelecer relação entre as alterações da flora intestinal e a severidade da doença e a existência de sintomas gastrointestinais, não tendo sido detetada correlação. [93]

Mesmo antes do aparecimento da doença, foram identificadas alterações no microbioma intestinal de crianças que vieram a apresentar padrões de comportamento típicos das DEA. Laue *et al.* [94] avaliaram a composição microbiana fecal ao longo dos primeiros anos de vida dos bebês, relacionando-a com o padrão de comportamento dessas crianças aos 3 anos de idade. Constatou-se que o surgimento de comportamentos adversos foi associado a uma elevada abundância relativa de *Flavonifactor plautii*, aos 6 meses, e de *Ruminococcus torques*, *Adlercreutzia equolifaciens*, *Eubacterium dolichum* e *Bacterium_6_1_63FAA* (família Lachnospiraceae), aos 12 meses.

Apesar de todas as diferenças identificadas na composição do microbioma, ainda não é totalmente claro se o padrão de colonização do microbioma de crianças com DEA é responsável pelos sintomas da doença. Com o objetivo de explorar as contribuições funcionais do microbioma intestinal nos padrões de comportamento das DEA, Sharon *et al.* [95] levaram a cabo um estudo onde se transplantou ratos *germ-free* com microbiota fecal de crianças com DEA ou com normal desenvolvimento. Verificou-se que a colonização com microbiota de indivíduos doentes foi suficiente para induzir padrões típicos de DEA nos ratos, nomeadamente comportamentos repetitivos e fraca capacidade de interação social. [95] A administração de ácido 5-aminoválico e taurina foi capaz de reverter esses comportamentos nos ratos, restabelecendo a sinalização inibitória do GABA. [95] Isto sugere que o microbiota intestinal foi capaz de regular o comportamento dos ratos através da produção de metabolitos neuroativos, que exercem a sua função pelo eixo intestino-cérebro, que poderá estar na base da fisiopatologia de DEA.

5.1.2 - Perturbação de hiperatividade e défice de atenção

A perturbação de hiperatividade e défice de atenção (PHDA) é uma doença do neurodesenvolvimento, cuja prevalência nas crianças ronda os 5%, em todo o mundo. [96,97] Tipicamente surge durante a infância e pode persistir até à idade adulta. Caracteriza-se por desatenção, hiperatividade e impulsividade, com impacto social significativo, nomeadamente, problemas na aprendizagem e nas relações sociais. [88,96] É considerada uma doença multifatorial, na medida em que se associa a variações genéticas em combinação com fatores ambientais, que se mostraram associados à etiologia, bem como às suas variações fenotípicas. [96] A terapêutica instituída tem como alvo vias dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e/ou serotonina. [96]

Foram identificadas diferenças entre a composição do microbioma entre indivíduos diagnosticados com PHDA e indivíduos saudáveis (Tabela 7). Szopinska-Tokov *et al.* [96] numa população que incluía adolescentes, quando comparadas as composições do microbiotas do grupo doente e do grupo saudável, identificaram-se diferenças ao nível de 10

gêneros, estando, no grupo com PHDA, um género em níveis mais baixos e nove em maior abundância (Tabela 7). A abundância relativa de *Ruminococcacea_UCG_004*, aumentada no grupo dos doentes, foi associada à falta de atenção. [96]

Estudaram-se os efeitos de alguns fatores de exposição ambiental nas crianças, como a antibioterapia e a dieta. Hamad *et al.* [97] num estudo retrospectivo, avaliaram se grávidas expostas a uma ou mais prescrições antibióticas durante a gravidez, apresentavam um risco aumentado de diagnóstico de PHDA na descendência. Constatou-se que essa exposição pré-natal não foi associada a um risco aumentado de doença. [97] A dieta foi sugerida como um modelador da doença, pelos seus efeitos no eixo intestino-cérebro. [96] Para se perceber o impacto da dieta no controlo da doença, Stevens *et al.* [98] estudaram uma população de crianças diagnosticadas com PHDA separadas em dois grupos, um submetido a placebo e outro submetido a suplemento de micronutrientes, para se identificar o efeito potencial da ingestão de micronutrientes na composição microbiota. Detetou-se uma diminuição na abundância de bactérias pertencentes ao filo Actinobacteria, das quais, foram as pertencentes aos género *Bifidobacterium* (espécies *B. longum* e *B. adolescentis*) que mais contribuíram para esta redução. Por outro lado, ocorreu um aumento em 20% dos níveis do género *Collinsella*. Este estudo não permitiu identificar consequências destas alterações no controlo da doença, uma vez que a amostra era apenas constituída por dezoito crianças, mas Stevens *et al.* referem estudos anteriores que apontam um papel benéfico de *Bifidobacterium* enquanto protetor do desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, incluindo PHDA. [98]

Apesar das diferenças identificadas entre a composição do microbioma intestinal de indivíduos com PHDA e indivíduos saudáveis, a contribuição destes microrganismos para a fisiopatologia desta doença ainda não está estabelecida. Tengeler *et al.* [99] colonizaram ratos *germ-free* com microbiota fecal de indivíduos diagnosticados com PHDA e indivíduos saudáveis, para avaliação das alterações nos padrões de comportamento e na estrutura e função cerebral desses ratos. Constatou-se que os ratos colonizados com microbiota de indivíduos doentes apresentaram diminuição da integridade estrutural da substância branca e cinzenta e diminuição do estado de repouso funcional, na ressonância magnética, e maiores níveis de ansiedade, no teste de campo aberto. [99] Apesar da ansiedade não ser específica de PHDA, não se pode apontar o microbiota como etiologia, mas a sua capacidade de moldar o comportamento e a função e estrutura cerebral foi evidente.

5.2 - Síndrome do intestino irritável

A síndrome do intestino irritável (SII) é uma doença funcional do intestino, comum em pediatria. Caracteriza-se por sintomatologia gastrointestinal recorrente, com episódios de dor e desconforto abdominal e alteração dos hábitos intestinais (diarreia, obstipação), sem

patologia orgânica identificável. [21] O papel do sistema nervoso central na patogénese do SII é fortemente sugerido pela associação da presença de distúrbios emocionais e stresse à exacerbação da clínica intestinal. [21] Esta doença tem um importante impacto na qualidade de vida das crianças, comprometendo as suas atividades de vida diária e o sucesso escolar. [100]

A etiologia do SII está associada tanto a fatores genéticos como ambientais, com um provável papel pouco preponderante dos fatores genéticos, uma vez que foi associada a uma concordância de apenas 17,2% em gémeos monozigóticos. [100] Do ponto de vista fisiopatológico, esta síndrome ainda não está totalmente compreendida. No entanto, Devanarayana e Rajindrajith [100] apresentam duas hipóteses para a compreensão da fisiopatologia, ambas assentes no eixo intestino-cérebro. Uma propõe que a semiologia da SII tem origem em alterações no sistema nervoso central, iniciada por vários agentes stressantes, como eventos de vida adversos, ansiedade e depressão, cuja interação com o intestino (através do sistema nervoso autónomo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal), condiciona perturbações que induzem a clínica gastrointestinal supracitada, nomeadamente hipersensibilidade visceral, alterações da motilidade, secreção (de cloreto, bicarbonato e muco), da resposta imune e no microbioma. [100] A outra hipótese propõe que agentes stressantes que atuam no intestino (infecção, inflamação, ativação imunitária, disbiose, dieta rica em hidratos de carbono e alergias alimentares) conseguem influenciar o sistema nervoso central, através de aferentes espinhais, do sistema nervoso simpático e da corrente sanguínea, induzindo perturbações neuropsiquiátricas. [28,100]

Uma alteração do microbioma intestinal é indicada como interveniente em ambas as vias fisiopatológicas anteriores, como causa ou consequência. De facto, na literatura foi identificada diferente composição do microbiota intestinal nestas crianças, comparativamente às saudáveis (Tabela 7).

Rigsbee *et al.* [22], numa população dos 8 aos 18 anos de idade, identificaram diferenças entre os microbiotas do grupo diagnosticado com SII (subtipo com predominância de diarreia) e do grupo de crianças saudáveis, apenas ao nível dos género e da espécie. Nas crianças com SII, verificaram-se níveis mais aumentados dos géneros *Veillonella*, *Prevotella*, *Lactobacillus* e *Parasporobacterium*, enquanto que membros de *Bifidobacterium* e *Verrucomicrobium* estavam em menor abundância. [22] *Veillonella* é produtora de acetato e propionato, que já foram relacionados com a severidade aumentada dos sintomas de SII. [22] Pärty *et al.* [101], num artigo de revisão, fazem referência a dois estudos em crianças com idade escolar, onde também se identificaram diferenças na composição do microbiota intestinal entre as crianças com SII e as crianças saudáveis. Num dos estudos, identificou-se

um aumento da abundância relativa do filo Proteobacteria (particularmente Gammaproteobacteria), e, no outro estudo, variações nas abundâncias relativas ao nível do género (não especificadas). [101] Devanarayana e Rajindrajith [100], no seu artigo de revisão, referem um estudo onde foi detetada uma percentagem significativamente mais elevada de *Haemophilus parainfluenza* no microbiota intestinal de crianças com SII. Igualmente, numa revisão, Felice e Mahony [88], é referido um estudo onde as crianças diagnosticadas com SII apresentavam uma frequência aumentada de dor abdominal relacionada com níveis mais elevados do género *Alistipes*.

As exposições ambientais capazes de moldar o microbioma, mostraram relação com o risco de doença. Num estudo retrospectivo, o parto por cesariana associou-se a um risco ligeiramente aumentado de desenvolver SII. [101] A antibioterapia, usada durante o primeiro ou segundo ano de vida, associou-se ao aumento do risco de surgimento de dor abdominal recorrente mais tarde da infância, no sexo feminino, no entanto esta associação não foi detetada no sexo masculino. [101] A interação do microbiota com a dieta pode também constituir um meio de lesão celular provocada pelos produtos de fermentação das proteínas e pela produção de gás. [100]

O desequilíbrio no microbioma intestinal mostrou intervenção na fisiopatologia de SII. Crouzet *et al.* [102] realizaram um estudo para explorar se a hipersensibilidade intestinal dos indivíduos com SII resulta de um envolvimento do microbiota intestinal. Inocularam-se ratos *germ-free* com microbiota fecal de adultos com SII ou de indivíduos saudáveis, verificando-se um aumento das contrações intestinais em resposta à distensão cólica nos ratos colonizados com microbiota de SII. [102] Assim, constatou-se que a hipersensibilidade intestinal de doentes SII foi transferida através do microbiota fecal, realçando o papel do microbioma na SII, através de metabolitos microbianos, uma vez que ao nível da mucosa intestinal dos ratos não foram encontradas alterações específicas. [102]

Conclusões

Neste trabalho é notório o impacto do microbioma intestinal pediátrico na saúde e na doença da criança, nomeadamente nas doenças alérgicas, autoimunes, metabólicas, do neurodesenvolvimento e síndrome do intestino irritável. Em todas elas se identificou diferenças na abundância relativa de microrganismos colonizadores do intestino, quando comparadas com crianças saudáveis.

O microbioma intestinal revelou-se fundamental para as defesas do hospedeiro, pela sua intervenção no desenvolvimento do sistema imunitário e na integridade da barreira intestinal. Também tem um papel na manutenção do equilíbrio da função do sistema nervoso central, através do eixo intestino-cérebro.

Nas doenças alérgicas, tendo por base o sistema imunitário, foi identificada uma influência do microbioma intestinal ao nível da diminuição da capacidade de produção de butirato, com perda de controlo da resposta imunitária. Bactérias com potencial anti-inflamatório encontraram-se diminuídas na asma e no eczema. Para doenças autoimunes o microbioma mostrou participar na fisiopatologia da DM1 através de diminuição da biossíntese de butirato ou processos de mimetização molecular, desregulando o sistema imunitário. Também as alterações ao nível do viroma intestinal foram encontradas. Na DC detetou-se perda de capacidade de digestão adequada do glúten. O microbioma participa na metabolização e recolha de energia dos alimentos, assim, nas doenças metabólicas identificou-se uma elevada atividade de fermentação dos alimentos, com aumento da utilizados dos substratos alimentares, predispondo a obesidade. Na NAFLD, a intervenção do microbioma faz-se através do metabolismo dos lípidos e ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias e stresse oxidativo. Nas doenças neurodesenvolvimento e no síndrome intestino irritável, o microbiota intestinal relaciona-se com a fisiopatologia através do eixo intestino-cérebro, pela produção de metabolitos microbianos, que atuam a nível cerebral ou a nível da parede intestinal.

Os fatores de exposição ambiental do bebé, mostraram conferir um risco aumentado de desenvolvimento destas doenças, pelo que é fulcral um controlo regrado destas exposições no início da vida, quando possível, como forma de proteção.

Dada a discrepância identificada entre a composição do microbioma intestinal de crianças saudáveis e doentes, seria pertinente objetivar futuramente o microbiota como alvo terapêutico, como forma de intervenção direcionada à etiologia da doença, através de probióticos e prebióticos.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Rui Vasco Quintas Gradiz e à Professora Doutora Anabela Mota Pinto agradeço a oportunidade que me foi dada para a realização deste trabalho. Agradeço também toda a disponibilidade para o esclarecimento das minhas questões, bem como a pertinência das orientações que me foram sendo dadas.

À minha mãe, ao meu pai e à minha avó agradeço todo o amor e apoio incondicional deste sempre.

Agradeço também aos meus amigos todo o amor e a presença constante em todos os momentos.

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição do microbioma intestinal.

Tabela 2 – Neurotransmissores produzidos por bactérias pertencentes ao microbioma intestinal.

Tabela 3 – Abundância relativa de microrganismos no microbioma intestinal de crianças com doença alérgica comparativamente a crianças saudáveis.

Tabela 4 – Abundância relativa de microrganismos no microbioma intestinal de crianças com doença autoimune comparativamente a crianças saudáveis.

Tabela 5 – Fatores protetores e não-protetores para a autoimunidade. Baseada em informação retirada de: Harrison's Principles of Internal Medicine [21].

Tabela 6 – Abundância relativa de microrganismos no microbioma intestinal de crianças com doença metabólica comparativamente a crianças saudáveis.

Tabela 7 – Abundância relativa de microrganismos no microbioma intestinal de crianças com doença por alteração do eixo intestino-cérebro comparativamente a crianças saudáveis.

Bibliografia

1. Dalby MJ, Hall LJ. Recent advances in understanding the neonatal microbiome. Vol. 9, F1000Research. 2020.
2. Deering KE, Devine A, O'sullivan TA, Lo J, Boyce MC, Christophersen CT. Characterizing The Composition of the Pediatric Gut Microbiome: A Systematic Review. *Nutrients*. 2019;12(1).
3. Goulet O, Hojsak I, Kolacek S, Pop TL, Cokugras FC, Zuccotti G, et al. Paediatricians play a key role in preventing early harmful events that could permanently influence the development of the gut microbiota in childhood. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*. 2019;108(11):1942–54.
4. Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology*. 2019;27(12):997–1010.
5. Yang R, Gao R, Cui S, Zhong H, Zhang X, Chen Y, et al. Dynamic signatures of gut microbiota and influences of delivery and feeding modes during the first 6 months of life. *Physiol Genomics*. 2019;51(8):368–78.
6. Castanys-Muñoz E, Martin MJ, Vazquez E. Building a Beneficial Microbiome from Birth. *Adv Nutr*. 2016;7(2):323–30.
7. Brown EM, Kenny DJ, Xavier RJ. Gut Microbiota Regulation of T Cells During Inflammation and Autoimmunity. Vol. 37, *Annual Review of Immunology*. 2019. p. 599–624.
8. Beghetti I, Biagi E, Martini S, Brigidi P, Corvaglia L, Aceti A. Human Milk's Hidden Gift: Implications of the Milk Microbiome for Preterm Infants' Health. *Nutrients*. 2019;11(12).
9. Gschwendtner S, Kang H, Thiering E, Kublik S, Fösel B, Schulz H, et al. Early life determinants induce sustainable changes in the gut microbiome of six-year-old children. *Sci Rep*. 2019;9(1).
10. Kim H, Sitarik AR, Woodcroft K, Johnson CC, Zoratti E. Birth Mode, Breastfeeding, Pet Exposure, and Antibiotic Use: Associations With the Gut Microbiome and Sensitization in Children. Vol. 19, *Current Allergy and Asthma Reports*. 2019.
11. Kumbhare S V, Patangia D V, Patil RH, Shouche YS, Patil NP. Factors influencing the gut microbiome in children: from infancy to childhood. *J Biosci*. 2019;44(2).

12. Fouhy F, Watkins C, Hill CJ, O'Shea CA, Nagle B, Dempsey EM, et al. Perinatal factors affect the gut microbiota up to four years after birth. *Nat Commun.* 2019;10(1).
13. Moore RE, Townsend SD. Temporal development of the infant gut microbiome. Vol. 9, *Open Biology.* 2019.
14. Reyman M, van Houten MA, van Baarle D, Bosch AATM, Man WH, Chu MLJN, et al. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nat Commun.* 2019;10(1).
15. Polos J, Fletcher J. Caesarean section and children's health: A quasi-experimental design. *Popul Stud (NY).* 2019;73(3):353–68.
16. Kim G, Bae J, Kim MJ, Kwon H, Park G, Kim SJ, et al. Delayed Establishment of Gut Microbiota in Infants Delivered by Cesarean Section. *Front Microbiol.* 2020;11.
17. McBurney MI, Davis C, Fraser CM, Schneeman BO, Huttenhower C, Verbeke K, et al. Establishing What Constitutes a Healthy Human Gut Microbiome: State of the Science, Regulatory Considerations, and Future Directions. Vol. 149, *Journal of Nutrition.* 2019. p. 1882–95.
18. Butler MI, Cryan JF, Dinan TG. Man and the Microbiome: A New Theory of Everything? Vol. 15, *Annual Review of Clinical Psychology.* 2019. p. 371–98.
19. Tapiainen T, Koivusaari P, Brinkac L, Lorenzi HA, Salo J, Renko M, et al. Impact of intrapartum and postnatal antibiotics on the gut microbiome and emergence of antimicrobial resistance in infants. *Sci Rep.* 2019;9(1).
20. Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. Vol. 10, *Nature Reviews Microbiology.* 2012. p. 735–42.
21. Jameson JL, Kasper DL, Longo DL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 20th ed. McGraw-Hill Education; 2018.
22. Rigsbee L, Agans R, Shankar V, Kenche H, Khamis HJ, Michail S, et al. Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(11):1740–51.
23. Elhag DA, Kumar M, Khodor S AI. Exploring the Triple Interaction between the Host Genome, the Epigenome, and the Gut Microbiome in Type 1 Diabetes. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* 2020.

24. Gallardo-Becerra L, Cornejo-Granados F, García-López R, Valdez-Lara A, Bikel S, Canizales-Quinteros S, et al. Metatranscriptomic analysis to define the Secrebiome, and 16S rRNA profiling of the gut microbiome in obesity and metabolic syndrome of Mexican children. *Microb Cell Fact.* 2020;19(1).
25. Hooper L V., Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. Vol. 336, *Science.* 2012. p. 1268–73.
26. Sivamaruthi BS, Suganthy N, Kesika P, Chaiyasut C. The Role of Microbiome, Dietary Supplements, and Probiotics in Autism Spectrum Disorder. Vol. 17, *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2020.
27. Ihekweazu FD, Versalovic J. Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. *Am J Med Sci.* 2018;356(5):413–23.
28. Forssberg H. Microbiome programming of brain development: implications for neurodevelopmental disorders. Vol. 61, *Developmental Medicine and Child Neurology.* 2019. p. 744–9.
29. Jenmalm MC. The mother–offspring dyad: microbial transmission, immune interactions and allergy development. Vol. 282, *Journal of Internal Medicine.* 2017. p. 484–95.
30. Baron R, Taye M, Der Vaart IB Van, Ujčić-Voortman J, Szajewska H, Seidell JC, et al. The relationship of prenatal antibiotic exposure and infant antibiotic administration with childhood allergies: a systematic review. *BMC Pediatr.* 2020;20(1).
31. Cait A, Cardenas E, Dimitriu PA, Amenyogbe N, Dai D, Cait J, et al. Reduced genetic potential for butyrate fermentation in the gut microbiome of infants who develop allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(6):1638–47.
32. Demirci M, Tokman HB, Uysal HK, Demiryas S, Karakullukcu A, Saribas S, et al. Reduced *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* levels in the gut microbiota of children with allergic asthma. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2019;47(4):365–71.
33. Macia L, Mackay CR. Dysfunctional microbiota with reduced capacity to produce butyrate as a basis for allergic diseases. Vol. 144, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2019. p. 1513–5.

34. Shen X, Wang M, Zhang X, He M, Li M, Cheng G, et al. Dynamic construction of gut microbiota may influence allergic diseases of infants in Southwest China. *BMC Microbiol.* 2019;19(1).
35. Stokholm J, Blaser MJ, Thorsen J, Rasmussen MA, Waage J, Vinding RK, et al. Maturation of the gut microbiome and risk of asthma in childhood. *Nat Commun.* 2018;9(1).
36. Ni J, Friedman H, Boyd BC, McGurn A, Babinski P, Markossian T, et al. Early antibiotic exposure and development of asthma and allergic rhinitis in childhood. *BMC Pediatr.* 2019;19(1).
37. Lamont RF, Luef BM, Jørgensen JS. Childhood inflammatory and metabolic disease following exposure to antibiotics in pregnancy, antenatally, intrapartum and neonatally. *Vol. 9, F1000Research.* 2020.
38. Aguilera AC, Dagher IA, Kloepfer KM. Role of the Microbiome in Allergic Disease Development. *Vol. 20, Current Allergy and Asthma Reports.* 2020.
39. Lee-Sarwar KA, Kelly RS, Lasky-Su J, Zeiger RS, O'Connor GT, Sandel MT, et al. Integrative analysis of the intestinal metabolome of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(2):442–54.
40. Zheng H, Liang H, Wang Y, Miao M, Shi T, Yang F, et al. Altered Gut Microbiota Composition Associated With Eczema in Infants. *PLoS One.* 2016;11(11).
41. Lee MJ, Kang MJ, Lee SY, Lee E, Kim K, Won S, et al. Perturbations of gut microbiome genes in infants with atopic dermatitis according to feeding type. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(4):1310–9.
42. Melli LCFL, Carmo-Rodrigues MS do, Araújo-Filho HB, Mello CS, Tahan S, Pignatari ACC, et al. Gut microbiota of children with atopic dermatitis: Controlled study in the metropolitan region of São Paulo, Brazil. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2020;48(2):107–15.
43. Oh S, Chin Yap G, Hong P-Y, Huang C-H, Aw MM, Pei-Chi Shek L, et al. Immune-modulatory genomic properties differentiate gut microbiota of infants with and without eczema. *PLoS One.* 2017;12(10).
44. Savage JH, Lee-Sarwar KA, Sordillo J, Bunyavanich S, Zhou Y, O'connor G, et al. A

- prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood Present address HHS Public Access. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2018;73(1):145–52.
45. Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, et al. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(4):1122–30.
 46. Feehley T, Plunkett CH, Bao R, Choi Hong SM, Culleen E, Belda-Ferre P, et al. Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nat Med.* 2019;25(3):448–53.
 47. Stiemsma LT, Michels KB. The Role of the Microbiome in the Developmental Origins of Health and Disease. *Pediatrics.* 2018;141(4).
 48. Pes GM, Bibbò S, Dore MP. Coeliac disease: beyond genetic susceptibility and gluten. A narrative review. Vol. 51, *Annals of Medicine.* 2019. p. 1–16.
 49. Verduci E, Mameli C, Amatruda M, Petitti A, Vizzuso S, El Assadi F, et al. Early Nutrition and Risk of Type 1 Diabetes: The Role of Gut Microbiota. Vol. 7, *Frontiers in Nutrition.* 2020.
 50. Russell JT, Roesch LFW, Ördberg M, Ilonen J, Atkinson MA, Schatz DA, et al. Genetic risk for autoimmunity is associated with distinct changes in the human gut microbiome. *Nat Commun.* 2019;10(1).
 51. Goodwin G. Type 1 Diabetes Mellitus and Celiac Disease: Distinct Autoimmune Disorders That Share Common Pathogenic Mechanisms. *Horm Res Paediatr.* 2020;92(5):285–92.
 52. Tetz G, Brown SM, Hao Y, Tetz V. Type 1 Diabetes: an Association Between Autoimmunity, the Dynamics of Gut Amyloid-producing *E. coli* and Their Phages. *Sci Rep.* 2019;9(1).
 53. Chibbar R, Dieleman LA. The Gut Microbiota in Celiac Disease and Probiotics. Vol. 11, *Nutrients.* 2019.
 54. Leiva-Gea I, Sánchez-Alcoholado L, Martín-Tejedor B, Castellano-Castillo D, Moreno-Indias I, Urda-Cardona A, et al. Gut Microbiota Differs in Composition and Functionality Between Children With Type 1 Diabetes and MODY2 and Healthy

- Control Subjects: A Case-Control Study. *Diabetes Care*. 2018;41(11):2385–95.
55. Insel R, Knip M. Prospects for primary prevention of type 1 diabetes by restoring a disappearing microbe. Vol. 19, *Pediatric Diabetes*. 2018. p. 1400–6.
 56. Olivares M, Benítez-Páez A, de Palma G, Capilla A, Nova E, Castillejo G, et al. Increased prevalence of pathogenic bacteria in the gut microbiota of infants at risk of developing celiac disease: The PROFICEL study. *Gut Microbes*. 2018;9(6):551–8.
 57. Cenit MC, Codoner-Franch P, Sanz Y. Gut Microbiota and Risk of Developing Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50.
 58. Traversi D, Rabbone I, Scaioli G, Vallini C, Carletto G, Racca I, et al. Risk factors for type 1 diabetes, including environmental, behavioural and gut microbial factors: a case–control study. *Sci Rep*. 2020;10(1).
 59. Vatanen T, Franzosa EA, Schwager R, Tripathi S, Arthur TD, Vehik K, et al. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature*. 2018;562(7728):589–94.
 60. Zhao G, Vatanen T, Droit L, Park A, Kostic AD, Poon TW, et al. Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(30).
 61. Ho J, Nicolucci AC, Virtanen H, Schick A, Meddings J, Reimer RA, et al. Effect of Prebiotic on Microbiota, Intestinal Permeability, and Glycemic Control in Children with Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(10):4427–40.
 62. Kempainen KM, Vehik K, Lynch KF, Larsson HE, Canepa RJ, Simell V, et al. Association Between Early-Life Antibiotic Use and the Risk of Islet or Celiac Disease Autoimmunity. *JAMA Pediatr*. 2017;171(12):1217–25.
 63. Olivares M, Walker AW, Capilla A, Benítez-Páez A, Palau F, Parkhill J, et al. Gut microbiota trajectory in early life may predict development of celiac disease. *Microbiome*. 2018;6(1).
 64. Stanislawski MA, Dabelea D, Wagner BD, Iszatt N, Dahl C, Sontag MK, et al. Gut Microbiota in the First 2 Years of Life and the Association with Body Mass Index at Age 12 in a Norwegian Birth Cohort. *MBio*. 2018;9(5).
 65. Karvonen AM, Sordillo JE, Gold DR, Bacharier LB, O'Connor GT, Zeiger RS, et al. Gut

- microbiota and overweight in 3-year old children. *Int J Obes.* 2019;43(4):713–23.
66. Altamirano-Barrera A, Uribe M, Chávez-Tapia NC, Nuño-Lámbarri N. The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease. Vol. 60, *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2018. p. 1–8.
 67. Riva A, Borgo F, Lassandro C, Verduci E, Morace G, Borghi E, et al. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ Microbiol.* 2017;19(1):95–105.
 68. Mbakwa CA, Hermes GDA, Penders J, Savelkoul PHM, Thijs C, Dagnelie PC, et al. Gut Microbiota and Body Weight in School-Aged Children: The KOALA Birth Cohort Study. *Obesity.* 2018;26(11):1767–76.
 69. Gao X, Jia R, Xie L, Kuang L, Feng L, Wan C. A study of the correlation between obesity and intestinal flora in school-age children. *Sci Rep.* 2018;8(1).
 70. Cortés-Martín A, Colmenarejo G, Selma MV, Espín JC. Genetic Polymorphisms, Mediterranean Diet and Microbiota-Associated Urolithin Metabotypes can Predict Obesity in Childhood-Adolescence. *Sci Rep.* 2020;10(1).
 71. Zhang M, Differding MK, Benjamin-Neelon SE, Østbye T, Hoyo C, Mueller NT. Association of prenatal antibiotics with measures of infant adiposity and the gut microbiome. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;18(1).
 72. Chelimo C, Camargo CA, Morton SMB, Grant CC. Association of Repeated Antibiotic Exposure Up to Age 4 Years With Body Mass at Age 4.5 Years. *JAMA Netw open.* 2020;3(1).
 73. Lavin T, Preen DB. Investigating Caesarean Section Birth as a Risk Factor for Childhood Overweight. *Child Obes.* 2018;14(2):131–8.
 74. Soderborg TK, Clark SE, Mulligan CE, Janssen RC, Babcock L, Ir D, et al. The gut microbiota in infants of obese mothers increases inflammation and susceptibility to NAFLD. *Nat Commun.* 2018;9(1).
 75. Stanislowski MA, Lozupone CA, Wagner BD, Eggesbø M, Sontag MK, Nusbacher NM, et al. Gut microbiota in adolescents and the association with fatty liver: the EPOCH study. *Pediatr Res.* 2018;84(2):219–27.
 76. Schwimmer JB, Johnson JS, Angeles JE, Behling C, Belt PH, Borecki I, et al.

- Microbiome Signatures Associated With Steatohepatitis and Moderate to Severe Fibrosis in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;157(4):1109–22.
77. Maessen SE, Derraik JGB, Binia A, Cutfield WS. Perspective: Human Milk Oligosaccharides: Fuel for Childhood Obesity Prevention? Vol. 11, *Advances in Nutrition*. 2020. p. 35–40.
 78. Sharpton SR, Ajmera V, Loomba R. Emerging Role of the Gut Microbiome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Composition to Function. Vol. 17, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019. p. 296–306.
 79. Yang YJ, Ni YH. Gut microbiota and pediatric obesity/non-alcoholic fatty liver disease. Vol. 118, *Journal of the Formosan Medical Association*. 2019.
 80. Diaz Heijtz R. Fetal, neonatal, and infant microbiome: Perturbations and subsequent effects on brain development and behavior. Vol. 21, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2016. p. 410–7.
 81. Ramírez-Carrillo E, Gaona O, Nieto J, Sánchez-Quinto A, Cerqueda-García D, Falcón LI, et al. Disturbance in human gut microbiota networks by parasites and its implications in the incidence of depression. *Sci Rep*. 2020;10(1).
 82. Flannery JE, Stagaman K, Burns AR, Hickey RJ, Roos LE, Giuliano RJ, et al. Gut Feelings Begin in Childhood: the Gut Metagenome Correlates with Early Environment, Caregiving, and Behavior. *MBio*. 2020;11(1).
 83. Loughman A, Ponsonby AL, O’Hely M, Symeonides C, Collier F, Tang MLK, et al. Gut microbiota composition during infancy and subsequent behavioural outcomes. *EBioMedicine*. 2020;52.
 84. Aatsinki A-K, Lahti L, Uusitupa HM, Munukka E, Keskitalo A, Nolvi S, et al. Gut microbiota composition is associated with temperament traits in infants. *Brain Behav Immun*. 2019;80:849–58.
 85. Sordillo JE, Korrick S, Laranjo N, Carey V, Weinstock GM, Gold DR, et al. Association of the Infant Gut Microbiome With Early Childhood Neurodevelopmental Outcomes: An Ancillary Study to the VDAART Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw open*. 2019;2(3).

86. Iglesias–Vázquez L, Riba GVG, Arijá V, Canals J. Composition of Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 12, *Nutrients*. 2020.
87. Ma B, Liang J, Dai M, Wang J, Luo J, Zhang Z, et al. Altered Gut Microbiota in Chinese Children With Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9.
88. Felice VD, O'Mahony SM. The microbiome and disorders of the central nervous system. Vol. 160, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2017. p. 1–13.
89. Srikantha P, Mohajeri MH. The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
90. Plaza-Díaz J, Gómez-Fernández A, Chueca N, de la Torre-Aguilar MJ, Gil Á, Perez-Navero JL, et al. Autism Spectrum Disorder (ASD) with and without Mental Regression is Associated with Changes in the Fecal Microbiota. *Nutrients*. 2019;11(2).
91. Sun H, You Z, Jia L, Wang F. Autism spectrum disorder is associated with gut microbiota disorder in children. *BMC Pediatr*. 2019;19(1).
92. Li N, Yang J, Zhang J, Liang C, Wang Y, Chen B, et al. Correlation of Gut Microbiome Between ASD Children and Mothers and Potential Biomarkers for Risk Assessment. *Genomics, Proteomics Bioinforma*. 2019;17(1):26–38.
93. Ahmed SAS, Elhefnawy AM, Azouz HG, Roshdy YS, Ashry MH, Ibrahim AE, et al. Study of the gut Microbiome Profile in Children with Autism Spectrum Disorder: a Single Tertiary Hospital Experience. *J Mol Neurosci*. 2020;70(6):887–96.
94. Laue HE, Korrick SA, Baker ER, Karagas MR, Madan JC. Prospective associations of the infant gut microbiome and microbial function with social behaviors related to autism at age 3 years. *Sci Rep*. 2020;10(1).
95. Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, Gandal MJ, Wang B, Kim YM, et al. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell*. 2019;177(6):1600–18.
96. Szopinska-Tokov J, Dam S, Naaijen J, Konstanti P, Rommelse N, Belzer C, et al. Investigating the Gut Microbiota Composition of Individuals with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Association with Symptoms. *Microorganisms*. 2020;8(3).

97. Hamad AF, Alessi-Severini S, Mahmud S, Brownell M, Kuo IF. Prenatal antibiotic exposure and risk of attention-deficit/hyperactivity disorder: a population-based cohort study. *CMAJ*. 2020;192(20):527–35.
98. Stevens AJ, Purcell R V., Darling KA, Eggleston MJF, Kennedy MA, Rucklidge JJ. Human gut microbiome changes during a 10 week Randomised Control Trial for micronutrient supplementation in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Sci Rep*. 2019;9(1).
99. Tengeler AC, Dam SA, Wiesmann M, Naaijen J, Van Bodegom M, Belzer C, et al. Gut microbiota from persons with attention-deficit/hyperactivity disorder affects the brain in mice. *Microbiome*. 2020;8(1).
100. Devanarayana NM, Rajindrajith S. Irritable bowel syndrome in children: Current knowledge, challenges and opportunities. Vol. 24, *World Journal of Gastroenterology*. 2018. p. 2211–35.
101. Pärtty A, Rautava S, Kalliomäki M. Probiotics on Pediatric Functional Gastrointestinal Disorders. Vol. 10, *Nutrients*. 2018.
102. Crouzet L, Gaultier E, Del’Homme C, Cartier C, Delmas E, Dapoigny M, et al. The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25(4).