



Atividade Física e Microbiota Intestinal

Júlio Coelho Simões

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Mestrado Integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Luís Ribeiro Themudo Barata

abril de 2023

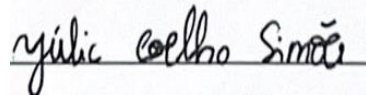
Folha em branco

Declaração de integridade

Eu, **Júlio Coelho Simões**, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição **39248** de **Medicina** da Faculdade **Ciências da Saúde**, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridade da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã **17/04/2023**

A handwritten signature in black ink that reads "Júlio Coelho Simões". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Folha em branco

Dedicatória

Aos meus pais.

À minha irmã.

À minha família.

Folha em branco

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Professor Doutor José Luís Ribeiro Themudo Barata como orientador, por todo o apoio e disponibilidade durante a realização desta dissertação.

Em segundo lugar, quero agradecer aos meus pais por me porem sempre em primeiro lugar e priorizarem a minha educação e à minha irmã por todo o apoio nos bons e maus momentos. Sem vocês, nada disto seria possível.

À Inês, pela paciência, companhia e por ser o pilar na minha vida que torna tudo mais fácil e feliz. Que a nossa caminhada continue e que ultrapassemos todas as adversidades lado a lado.

Aos meus amigos, por todas as memórias e histórias inesquecíveis, ao longo destes 6 anos.

E por último, mas não menos importante, à Covilhã.

Folha em branco

Prefácio

Tal como pai da medicina, Hipócrates, disse: “*A morte reside nos intestinos*” e “*Má digestão é a raiz de todo o mal*”.

Folha em branco

Resumo

A Atividade Física (AF) tem um importante papel no bem-estar e funcionamento do corpo humano, conhecendo-se múltiplos benefícios do exercício nos vários aparelhos e sistemas. Mais recentemente, com a identificação da Microbiota Intestinal (MI) e com o reconhecimento da sua importância na modulação de vários mecanismos dos diversos aparelhos e sistemas, colocou-se a hipótese de grande parte dos benefícios da AF ser exercida de modo indireto, via modulação da MI.

A microbiota são os microrganismos (MO) que compõem uma região específica como, por exemplo, o intestino, a vagina ou a pele. É um “órgão” descoberto recentemente que, muitas vezes, é “esquecido” ou “ignorado”, mas que quando se encontra em equilíbrio, é essencial à promoção da saúde e à prevenção de doenças.

Os estudos existentes começaram a revelar-nos o verdadeiro panorama e constituição de uma global, dinâmica e saudável microbiota e as vantagens desta na saúde do seu hospedeiro.

Como a nutrição e o estilo de vida têm cada vez mais relevo, muito mais estudos se farão no futuro relativamente a este tema, principalmente estudos longitudinais, estudando a influência de vários fatores a longo prazo na microbiota.

Objetivo e Metodologia

Esta dissertação visou responder à seguinte questão: “De que forma a Atividade Física consegue modular a Microbiota Intestinal?”. De forma a conseguir obter uma resposta para esta questão, foi realizada uma revisão de diversos artigos. A pesquisa bibliográfica desses artigos foi feita nas bases de dados eletrônicas *Pubmed* e na *Google Scholar*, com os seguintes critérios de inclusão: artigos dos últimos 10 anos de publicação e artigos que se debruçam sobre qualquer tipo de atividade física e que estabelecem relação com a microbiota intestinal. A pesquisa foi efetuada entre julho de 2022 e janeiro de 2023 e foram selecionados artigos escritos em língua inglesa e portuguesa.

Resultados

Após a leitura e análise de diversos artigos foram identificadas diversas associações entre o Exercício Físico e a Microbiota Intestinal, sendo o exercício extremamente

benéfico para a saúde microbiana, independentemente da idade dos grupos de estudo e da metodologia utilizada.

Conclusão

A relação entre estes dois fatores foi comprovada após esta revisão. Trata-se de um tópico que terá cada vez mais importância no mundo da saúde e do esporte, possuindo ainda muito conteúdo para explorar.

Palavras-chave

Atividade Física; Microbiota Intestinal; Interação; Disbiose; Dieta;

Folha em branco

Lista de Definições

Atividade Física (AF) é qualquer atividade baseada no movimento do corpo, que promova um gasto energético maior que o repouso. São exemplos de atividade física subir as escadas, arrumar a casa ou jogar futebol. O exercício físico (EF) encontra-se dentro dos tipos de atividade física.

Exercício Físico é uma atividade estruturada e sistematizada, de uma intensidade pelo menos moderada e com um objetivo final. Este, por ser mais intenso, resulta em maiores adaptações da musculatura e do sistema cardiovascular (CV), comparativamente com a AF do estilo de vida. São exemplos de EF os desportos como a corrida, a natação, atividades de ginásio e a marcha rápida.

Microbiota Intestinal (MI) é o conjunto de triliões de MO como bactérias, vírus e fungos que habitam o trato gastrointestinal (TGI). Ela tem um papel essencial na fisiologia e saúde do hospedeiro. Segundo alguns autores, a microbiota pode pesar até 2 Kg e participa na digestão, função metabólica, na proteção contra infeções e em muitos mais processos. (1) Microbioma é o conjunto de genes presentes nessa microbiota.

Phylum (plural Phyla) é uma unidade taxonómica utilizada na classificação científica de seres vivos que divide os reinos existentes. Cada *Phylum* engloba diferentes classes e estas dividem-se em várias ordens, famílias, géneros e espécies (por ordem decrescente). Estes conceitos serão essenciais para distinguir diversos microrganismos que compõem a MI. (21)

Táxon (plural Taxa) é uma unidade taxonómica associada à classificação de seres vivos. São exemplos de *Taxa* o reino, ordem, género e espécie. (20)

Folha em branco

Abstract

Physical Activity (PA) plays an important role in the well-being and functioning of the human body, with multiple benefits of exercise being known in various devices and systems. More recently, with the identification of the Intestinal Microbiota (IM) and with the recognition of its importance in the modulation of several mechanisms of the different devices and systems, it was hypothesized that a large part of the benefits of PA be exercised indirectly, via modulation from MI.

The microbiota are the microorganisms (OM) that make up a specific region such as, for example, the intestine, vagina or skin. It is a recently discovered “organ” that is often “forgotten” or “ignored”, but which, when in balance, is essential for health promotion and disease prevention.

The existing studies began to reveal to us the true panorama and constitution of a global, dynamic and healthy microbiota and the advantages of this in the health of its host.

As nutrition and lifestyle are increasingly important, much more research will be done in the future on this topic, mainly longitudinal studies, studying the long-term influence of various factors on the microbiota.

Objectives and Methodology

This dissertation aimed to answer the following question: “How can Physical Activity modulate the Intestinal Microbiota?”. In order to obtain an answer to this question, a review of several articles was carried out. The bibliographical research of these articles was carried out in the electronic databases Pubmed and Google Scholar, with the following inclusion criteria: articles from the last 10 years of publication and articles that focus on any type of physical activity and that establish a relationship with the microbiota intestinal. The research was carried out between July 2022 and January 2023 and articles written in English and Portuguese were selected.

Results

After reading and analyzing several articles, several associations were identified between Physical Exercise and the Intestinal Microbiota, with exercise being extremely

beneficial for microbial health, regardless of the age of the study groups and the methodology used.

Conclusion

The relationship between these two factors was proven after this review. This is a topic that will become increasingly important in the world of health and sport, and it still has a lot of content to explore.

Keywords

PhysicalActivity;IntestinalMicrobiota;Interaction;Disbiosis;Diet

Folha em branco

Definition's list

Physical activity (PA) is any activity based on body movement, which promotes energy expenditure greater than rest. Examples of physical activity are climbing the stairs, cleaning the house or playing soccer. Physical exercise (PE) is within the types of physical activity.

Physical Exercise is a structured and systematized activity, of at least moderate intensity and with a final objective. This, being more intense, results in greater adaptations of the musculature and the cardiovascular (CV) system, compared to lifestyle PA. Examples of PE are sports such as running, swimming, gym activities and fast walking.

Intestinal Microbiota (IM) is the set of trillions of microorganisms such as bacteria, viruses and fungi that inhabit the gastrointestinal tract (GIT). It plays an essential role in host physiology and health. According to some authors, the microbiota can weigh up to 2 kg and participate in digestion, metabolic function, protection against infections and many more processes. (1) Microbiome is the set of genes present in this microbiota.

Phylum (plural Phyla) is a taxonomic unit used in the scientific classification of living things that divides existing kingdoms. Each Phylum encompasses different classes and these are divided into several orders, families, genera and species (in descending order). These concepts will be essential to distinguish different microorganisms that make up the gut microbiota (21)

Taxon (plural Taxa) is a taxonomic unit associated with the classification of living beings. Examples of Taxa include kingdom, order, genus, and species. (20)

Folha em branco

Índice

Declaração de integridade	iii
Dedicatória	v
Agradecimentos	vii
Prefácio	ix
Resumo	xi
Objetivo e Metodologia	xi
Palavras-chave	xii
Lista de Definições	xiv
Abstract.....	xvi
Objectives and Methodology.....	xvi
Keywords	xvii
Definition’s list.....	xix
Lista de Figuras	xxiii
Lista de Acrónimos.....	xxv
Capítulo 1. Sobre a Microbiota.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Constituição da Microbiota Intestinal.....	1
1.3 Instituição e evolução da Microbiota	2
1.4 Funções da Microbiota Intestinal	3
1.5 Disbiose	5
Capítulo 2. Variabilidade da Microbiota	6
2.1 Ratio Firmicutes/Bacteroidetes e a sua relevância	6
2.2 Dieta.....	7
Capítulo 3. Atividade Física e Microbiota Intestinal	9
3.1 Efeitos da AF na MI.....	9
3.2 MI – órgão secretor de Neurotransmissores	10
3.3 MI e diferentes tipos de AF	12
3.4 AF e conseqüentes alterações taxonómicas/microbiais	15
3.5 Probióticos – ajudam no EF?	17
3.6 Papel do EF e da MI na proteção e prevenção de doenças intestinais	20
3.7 Papel do EF e da MI na proteção e prevenção de outras doenças	21
Conclusão.....	24
Referências bibliográficas	27

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1 – Diferentes phyla e a hierarquia taxonômica (25)

Figura 2 – Ação de diferentes fatores na MI e as suas consequências (4)

Figura 3 – Impacto das células intestinais e da MI na produção de NT (64)

Figura 4 – Benefícios do EF de resistência nos hospedeiros (4)

Figura 5 - Interações entre o EF, a MI e as consequências na performance desportiva (8)

Figura 6 – Efeitos e consequências do EF na MI (51)

Figura 7 – Ilustração de probióticos e de espécies prejudiciais (65)

Folha em branco

Lista de Acrónimos

AF	Atividade Física
EF	Exercício Físico
MI	Microbiota Intestinal
CV	Cardiovascular
TGI	Trato Gastrointestinal
MO	Microrganismos
IG	Intestino Grosso
GAG	Glicosaminoglicanos
AG	Ácidos Gordos
IL6	Interleucina-6
TNF	Tumor Necrosis Factor
DMII	Diabetes Mellitus 2
ATB	Antibióticos
AGCC	Ácidos Gordos de Cadeia Curta
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
LPS	Lipopolissacarídeos
NT	Neurotransmissores
SNA	Sistema Nervoso Autónomo
SNE	Sistema Nervoso Entérico
NPY	Neuropéptido Y
FC	Frequência Cardíaca
SI	Sistema Imunitário
ITR	Infeção de Trato Respiratório
TGL	Triglicerídeos
AB	Ácidos Biliares
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
CCR	Cancro Colorretal
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
EV	Estilo de Vida
IMC	Índice de Massa Corporal
F/B	Firmicutes/Bacteroidetes

Folha em branco

Capítulo 1. Sobre a Microbiota

1.1 Introdução

Até há pouco tempo, era escasso o conhecimento sobre o impacto sistêmico da microbiota intestinal (MI). As melhorias na tecnologia, na análise de dados e na sequenciação do DNA permitiram que o número de estudos, deste tema, tivesse aumentado exponencialmente (3). O aumento do interesse comprovou uma correlação entre a Microbiota Intestinal e a saúde de diferentes órgãos do seu hospedeiro, via modulação metabólica, imunitária e endócrina. (6)

Avaliar a função microbiana através da metagenômica poderá ser importante no futuro, mas a análise e processamento dos dados ainda são bastante caros e complexos. Técnicas como “metatranscriptomics” têm-se desenvolvido bastante nos últimos anos e conseguem elucidar-nos que genes é que são expressos pelo microbioma durante a sua atividade e, para além disso, consegue estimar a composição taxonômica da população microbiana.

Neste capítulo irão ser brevemente descritas a instituição e constituição da MI no hospedeiro e quais as suas principais funções, elucidando a importância da manutenção de uma microbiota saudável. Muitas destas funções são moduladas pela atividade física e a sua compreensão é essencial para perceber a interação entre as duas variáveis.

1.2 Constituição da Microbiota Intestinal

A maioria dos estudos em humanos focam-se na comunidade microbiana do cólon, pois é este que aporta a maior biomassa de qualquer órgão no organismo, superando (em número) as células e genes do resto do corpo. Cada milímetro do cólon contém 10^{11} de células microbianas e é estimado que 150 a 400 espécies bacterianas vivam no intestino de cada pessoa. O trabalho e os recursos que seriam necessários para avaliar cada uma delas e a dificuldade na sua distinção, através de exames de cultura, faz com que seja complicado saber o número exato de espécies. (1,3,6,8)

Grande parte destas espécies pertence a 2 *phyla* principais: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Relativamente às espécies, as *Bacteroides* são muito prevalentes, as *Bifidobacterium*,

Lactobacillus e *Streptococcus* encontra-se em menor número e o *Clostridium* é quase inexistente.

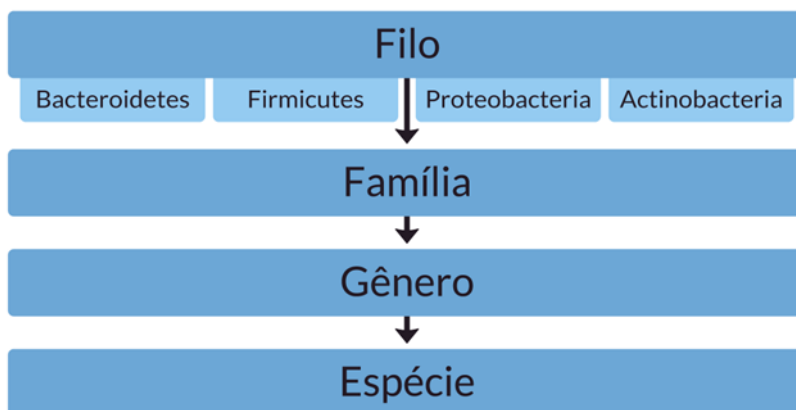


Figura 1 – Diferentes *phyla* e a hierarquia taxonômica (25)

O estudo da microbiota sempre se focou, essencialmente, nas bactérias. No entanto, a microbiota humana inclui a árvore filogenética da vida e, por isso, vírus e arqueia. O viroma é extenso e sabe-se que tem um papel importante nos ecossistemas. *Fungi* como a *Candida*, apesar de raros, são capazes de crescer em populações saudáveis. (2)

Por isso, para além de bactérias, a MI é composta por vírus, fungos e outros microrganismos, sejam eles procariontes ou eucariontes, que coevoluíram ao longo do tempo com o hospedeiro. Sabe-se ainda, que as interações entre estes são fundamentais para o balanço e saúde da microbiota. (2)

Quanto à capacidade de sobrevivência de determinadas espécies na microbiota, há 2 principais motivos que induzem a filtração de micróbios: competição entre diferentes espécies e habilidade para sobreviver no habitat. Se uma espécie não for capaz de resistir a estes condicionantes, deixa de constituir a MI. (3)

1.3 Instituição e evolução da Microbiota

O intestino fetal é praticamente estéril e a sua colonização inicia-se após o nascimento. Esta depende da genética, tipo de parto e da dieta do bebé. A MI influencia o sistema imunitário, estimulando a imunidade e inibindo doenças autoimunes, sendo o parto por via vaginal um estímulo importante para a fundação de uma microbiota saudável no recém-nascido. Por outro lado, a cesariana pode associar-se ao crescimento de MO oportunistas que podem persistir, no mínimo, até ao primeiro ano de vida e contribuir para infeções do bebé. (2)

Nos primeiros anos de vida, os principais fatores moduladores da MI são a exposição a infecções/antibióticos, as condições de higiene, a vacinação completa e a dieta. Com o avançar da idade, a MI vai ficando mais estável, resistente e resiliente, características de uma microbiota saudável. Esta tem capacidade de resistir a uma perturbação (infecção, alteração da dieta ou medicação) e regressar ao estado basal. Podemos, com isto, afirmar que a composição microbiana não é constante e imutável, encontrando-se em permanente equilíbrio dinâmico e mudança. (2)

Uma microbiota saudável confere maior capacidade e aptidão do hospedeiro no combate a doenças. Este efeito é mais eminente aquando do envelhecimento, período onde a redução da diversidade de microrganismos intestinais pode resultar na perda de anos de vida. Torna-se, assim, imperativo uma manutenção da saúde microbiana nesta fase da vida, através de uma alimentação saudável e da prática regular de atividade física. (3,4)

É muito provável que o hospedeiro e a sua microbiota intestinal partilhem uma história evolutiva. Em roedores, transplantes microbianos da mesma espécie conseguem colonizar e adaptar-se mais facilmente ao seu hospedeiro, comparativamente com transplantes de outras espécies, evidenciando especificidade. (3) Para além disso, os roedores que receberam microrganismos de uma espécie diferente não conseguiram atingir o seu potencial imunitário, destacando a importância da MI na saúde do hospedeiro. (26)

1.4 Funções da Microbiota Intestinal

A MI possui uma rica variedade interpessoal, mesmo no seu estado basal, o que complica a identificação de desequilíbrios em situações de disrupção ou doença. Tendo em conta esta variedade entre indivíduos saudáveis, tornou-se impossível caracterizar a saúde de uma microbiota através da sua constituição. Não obstante, constatou-se que, constituições diferentes de microbiota conseguem desempenhar as mesmas funções com qualidade e eficácia, usando vias metabólicas similares. Com isto, concluiu-se que existe um núcleo funcional, onde funções metabólicas e moleculares são realizadas pela microbiota, dentro de um habitat, mas que não são executadas pelos mesmos organismos, em pessoas diferentes. (2,14)

Atividade Física e Microbiota Intestinal

Esse núcleo funcional inclui a capacidade do microrganismo sobreviver e se reproduzir no intestino e a produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), vitaminas e aminoácidos essenciais. (2)

A produção de AGCC (butirato, propionato, acetato e lactato) ocorre via fermentação de carboidratos e degradação de glicosaminoglicanos (GAG). De seguida, estes são absorvidos no intestino e metabolizados em diversos tecidos, representando uma das funções mais importantes da MI.

Os AGCC atuam ao nível das células musculares ao promover a atividade mitocondrial. Uma oxidação de ácidos gordos (AG) eficaz é essencial no “remodeling”, na resposta à insulina e ao limitar a mioesteatose. Por isso, um número reduzido de AGCC resulta numa maior resistência à insulina e acumulação de gordura nos músculos. (4,9) Estaki *et al.* reportou que um aumento de produção de AGCC e a redução da biossíntese de Lipopolissacarídeos (LPS) por bactérias gram-negativas garante um papel protetor nas doenças inflamatórias e nas doenças crónicas não transmissíveis (DCNT). (6,8,17)

O butirato advém, principalmente, da fermentação da fibra da dieta e é o AGCC que melhor responde ao EF. Matsumoto *et al.* foi o primeiro a demonstrar que 5 semanas de exercício contínuo resultou numa elevação considerável dos níveis de butirato. (50) Este AG é o maior combustível dos colonócitos, promove a integridade do intestino, aumentando a proliferação de células epiteliais (fortalecendo a barreira intestinal) e regula o SI, conseguindo alterar a expressão genética de células saudáveis (com efeitos anti-inflamatórios) e cancerígenas do hospedeiro. (1,48)

Como referido anteriormente, o butirato aumenta após a AF, prolonga a saciedade pós-prandial e é conhecido por ser pró-anabólico, associando-se, portanto, a um aumento da massa magra e diminuição do IMC. (4) Por último, este tem um efeito protetor nas DCNT, atuando como sensor do estado energético do hospedeiro, ajudando na regulação dos níveis de colesterol, no metabolismo dos lípidos e da glicose no fígado e nos músculos. (6,9)

Relativamente aos lipopolissacarídeos (LPS), estes aumentam após dietas ricas em gordura, no sedentarismo e quando a diversidade de bactérias gram-negativas diminui, pois são estas que impedem a sua absorção. Os LPS funcionam como antigénios e estimulam a resposta imune do hospedeiro, atuando como gatilho para a síntese de citocinas inflamatórias. Valores elevados de LPS associam-se, por isso, a estados pró-inflamatórios e, conseqüentemente, a efeitos deletérios à saúde do hospedeiro. (18,37)

Tal como a atividade física, a MI tem interferência no perfil lipídico e nos níveis de colesterol. Uma microbiota saudável é capaz de inibir a ligação do colesterol à superfície celular e, conseqüentemente, diminuir a sua absorção. Um exemplo deste efeito são as *Bifidobacterium*, que diminuem os valores de LDL e associam-se a um aumento de HDL-c no soro. (9)

Outra das principais funções da MI é a manutenção da impermeabilidade da mucosa intestinal, evitando a absorção de produtos bacterianos e a ativação de respostas inflamatórias. Esta capacidade é importante principalmente em momentos de agressão, stress oxidativo e numa fase mais avançada da vida, devido ao envelhecimento das “tight junctions”.

Os benefícios que a atividade física exerce sobre a MI têm por base a modulação de muitas destas funções microbianas, tal como será abordado no capítulo 3.

1.5 Disbiose

Por estar envolvida em processos fisiológicos, é correto presumir que uma disrupção/perturbação do funcionamento da microbiota intestinal (disbiose) prolonga, exacerba ou induz prejuízo à saúde do hospedeiro.

O sedentarismo é um conhecido disruptor da saúde microbiana, mas não é o único. A idade avançada, os alimentos ricos em gordura, o stress, a má qualidade do sono e o uso de antibióticos (ATB) também se associam a conseqüências nefastas na MI. (6) Estas perturbações estão, geralmente, relacionadas a inúmeras doenças, agudas ou crónicas, envolvendo todos os sistemas do organismo como Diabetes Mellitus II (DMII), alergias, asma, obesidade, doenças inflamatórias e alguns cancros (2,3,9,15).

Capítulo 2. Variabilidade da Microbiota

2.1 Ratio Firmicutes/Bacteroidetes e a sua relevância

Como dito anteriormente, a maior parte das bactérias que constituem a MI pertencem a duas phyla: Bacteroidetes e Firmicutes. A sua elevada prevalência tornou-as objeto de estudo, particularmente aplicado em diferentes contextos como o **exercício físico**, obesidade e doenças inflamatórias/crónicas.

Vários estudos associaram uma grande diminuição ou aumento do ratio Firmicutes/Bacteroidetes (F/B), ou seja, uma alteração significativa de uma ou das duas phyla, a fatores negativos na saúde. De facto, estudos em animais demonstraram que vantagens como o aumento na produção de AGCC pela microbiota, um aumento de sensibilidade à insulina e síntese proteica, relacionam-se com um valor médio e equilibrado de F/B. (4,16)

Um grande aumento do ratio F/B é mais nocivo que a sua diminuição. Este aumento é característico do envelhecimento e da obesidade, sendo muitas vezes encontrado em crianças obesas e diabéticos. (6) Diferentes estudos associam a formação de placas ateroscleróticas à espécie de Firmicutes, sendo que o mecanismo envolvido parece ser a diminuição da produção de butirato, levando à acumulação de gordura nos tecidos.

Em geral, a abundância de Firmicutes associa-se a ganho de peso. (6,9) Por outro lado, uma maior prevalência de Bacteroidetes é mais comum em pessoas magras e naquelas que praticam atividade física regular com vista a perder peso, sugerindo que a obesidade tem um componente microbiano. (8)

Pode-se concluir que o ratio F/B é influenciado pelos hábitos do hospedeiro, principalmente a AF, como veremos posteriormente. Um ratio F/B elevado é mais prejudicial para a saúde do hospedeiro do que a sua diminuição, sendo o cenário ideal, ter um ratio equilibrado sem grandes variações.

2.2 Dieta

Juntamente com o exercício físico, a disponibilidade de nutrientes é um dos principais fatores envolvidos na filtração de MO no habitat do intestino, daí a dieta ser muito importante na formação da microbiota. Outros fatores envolvidos são o comprimento do TGI, a peristalse, o pH, o nível de O₂, a imunidade, etc. (3)

Sabe-se que uma dieta rica em fibras e pobre em gorduras estimula o (bom) crescimento bacteriano, a produção de AGCC e consegue diminuir os níveis de citocinas inflamatórias e de lipopolissacarídeos (LPS). (9)

As gorduras e os AG polinsaturados associam-se a disrupção da função de barreira intestinal, a um aumento de endotoxinas, à expressão de linfócitos na circulação e, portanto, a efeitos negativos na microbiota e no organismo. (5)

Alguns estudos indicam que dietas altamente proteicas resultam em diminuição das espécies saudáveis na microbiota como as *Bifidobacterium*, para além disso, resultam na fermentação de AA no cólon, metabolitos indesejados como ureia e aumento do pH das fezes. Os efeitos do excesso de proteínas podem ser contrabalançados com a adição de fibras e amido resistente na dieta habitual, demonstrando a importância das fibras na alimentação e na saúde intestinal. (4,8)

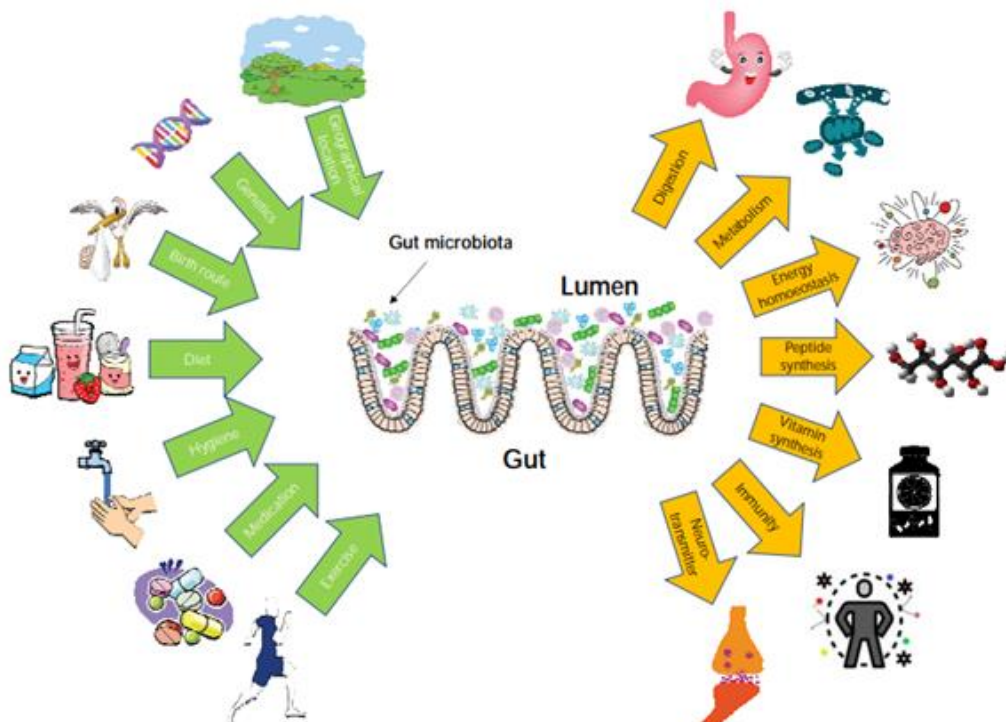


Figura 2 – Ação de diferentes fatores na MI e as suas consequências (4)

Atividade Física e Microbiota Intestinal

Os efeitos positivos da dieta na MI levantam uma questão: serão estes benefícios idênticos aos da AF na saúde microbiana?

Essa problemática foi abordada num estudo que envolveu a dieta mediterrânea. Neste estudo, realizado ao longo de 1 ano, por Muralidharan *et al.*, compararam-se 2 grupos: um deles cumpriu apenas a dieta mediterrânea e o outro, para além da dieta mediterrânea, aumentou a sua AF durante este período. Os resultados foram esclarecedores: no grupo sujeito a dieta + exercício, houve uma maior diminuição de espécies de Firmicutes prejudiciais como *Haemophilus*, diminuindo o ratio F/B. Para além disso, este grupo apresentou maior perda de peso e de circunferência abdominal, uma diminuição de TGL e de LDL e um aumento de HDL. Isto indica-nos que a dieta e a prática de exercício têm uma relação aditiva e simbiótica no que toca à melhoria da microbiota e da saúde do hospedeiro. (11)

Por isso, a relação entre a dieta e a MI é dependente e bidirecional, pois a saúde da MI é essencial para obtermos um benefício total da nossa alimentação e a alimentação tem uma enorme influência na composição microbiana. (19)

Capítulo 3. Atividade Física e Microbiota Intestinal

3.1 Efeitos da AF na MI

Como referido anteriormente, a MI possui uma enorme variedade microbiana e a sua composição é alterada por vários fatores como nutrição, AF, stress, idade e genética. Mesmo assim, as consequências da dieta ou do EF devem ser mantidas por longos períodos, para serem benéficas para a saúde e para alterarem, eficazmente, o genoma e a taxonomia da MI, pois esta apresenta uma enorme estabilidade perante estímulos externos. (1)

Estudos no interior do TGI têm aumentado a nossa compreensão na comunicação bidirecional entre o hospedeiro e a microbiota (uma relação simbiótica) e no papel desta na gênese de doenças crônicas. A maior exploração desta temática permite-nos determinar o impacto e consequências que os comportamentos e hábitos do hospedeiro têm na microbiota, sendo a atividade física um dos principais fatores moduladores.

Sabe-se que a AF a longo prazo tem um efeito positivo na saúde do organismo e um papel essencial na prevenção de DCNT, conseguindo melhorar o metabolismo da glicose, diminuindo os valores de triglicéridos e da pressão arterial (PA) e aumentando os de HDL. Adaptações fisiológicas como a hipertrofia muscular, aumento da massa magra e angiogénese são algumas das saudáveis consequências do EF contínuo e regular. (6,10) Os efeitos do exercício na saúde microbiana têm emergido como chave de interesse nos estudos de doenças metabólicas e neoplásicas. (10)

Campbell *et al.* mostraram que o exercício provoca efeitos na MI independentes de qualquer outro fator, estando associado à modulação positiva da biodiversidade da MI, à alteração do número de células B e T, à produção de AGCC e à perda de peso. (8,24)

O exercício é um stressor fisiológico da microbiota que resulta na evolução e resiliência das células. Por isso, este prepara a resposta das células para situações de maior stress e previne a destruição das tight junctions, entre as células epiteliais (8,24) O EF aumenta a percentagem de *Bacteroidetes*, diminuindo o ratio *F/B* e promove, principalmente nas idades jovens, o crescimento de espécies que otimizam o desenvolvimento da função cerebral, espelhando a importância da AF durante a infância e adolescência.

3.2 MI – órgão secretor de Neurotransmissores

Evidências mostram que a MI consegue modular neurotransmissores (NT) excitatórios e inibitórios como a serotonina, GABA e a dopamina, especialmente em situações de stress físico ou emocional. Como é sabido, o EF de resistência implica um stress tanto físico como psicológico e, por isso, a MI tem um papel relevante na capacidade dos atletas: (27)

- Controlando o stress oxidativo, conseqüente do esforço.
- Diminuindo a resposta inflamatória ao exercício.
- Economizando melhor o gasto metabólico e energético. (5)

O stress induzido pelo exercício ativa o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e aumenta a liberação de NT nos tecidos periféricos, como o TGI. A comunicação bidirecional entre o SNA e o Sistema Nervoso Entérico (SNE) ocorre através do nervo vago e por liberação de hormonas e moléculas vindas da MI. (29) Com isto, o TGI responde ao stress, libertando hormonas como o **GABA**, o **neuropéptido Y (NPY)**, a **dopamina** e a **serotonina**. (28,30)

O **GABA**, principal NT inibidor do SNC, regula a pressão arterial e frequência cardíaca (FC) e altera algumas funções gastrointestinais como motilidade, esvaziamento gástrico e relaxamento do esfíncter esofágico inferior. O EF moderado consegue aumentar os níveis de GABA no hipotálamo e a longo prazo consegue diminuir a pressão arterial, a FC e o tónus simpático. (31)

O **NPY** também é libertado no TGI, após estímulos causadores de stress como o EF intenso, e tem um papel importante na resiliência ao stress e nos processos inflamatórios. Ramson *et al.* estudaram a variabilidade dos níveis de NPY, em 12 canoístas de alta competição, e concluíram que estes aumentam significativamente no pós-exercício, concluindo que uma das possíveis adaptações ao exercício de força e resistência pode passar pela liberação deste NT pela MI. (33)

A **dopamina** também pode ser sintetizada durante situações de stress no TGI, mas os seus níveis de produção dependem de bactérias específicas produtoras de dopamina e do tipo de stress experienciado. Foi demonstrado que AF de 1 a 2 horas por dia consegue aumentar os níveis de dopamina no cérebro. (33)

Segundo Clarke *et al.* (34), algumas espécies de bactérias estão envolvidas na liberação e produção de diferentes tipos de NT como, por exemplo:

- ***Lactobacillus rhamnosus*** regulam a expressão de recetores de **GABA**.
- ***Proteus vulgaris*** e ***Bacillus mycoides*** produzem **dopamina**.
- ***Bifidobacterium dentium DPC6333***, ***Bifidobacterium dentium NCFB2243*** e ***Lactobacillus brevis DPC6108*** são eficazes na produção de **GABA**.
- ***Lactobacillus plantarum (FI8595)***, ***Streptococcus thermophilus (NCFB2392)*** produzem **serotonina**.
- **Butirato** e **acetato** produzidos pelas bactérias induzem a síntese de **serotonina**.

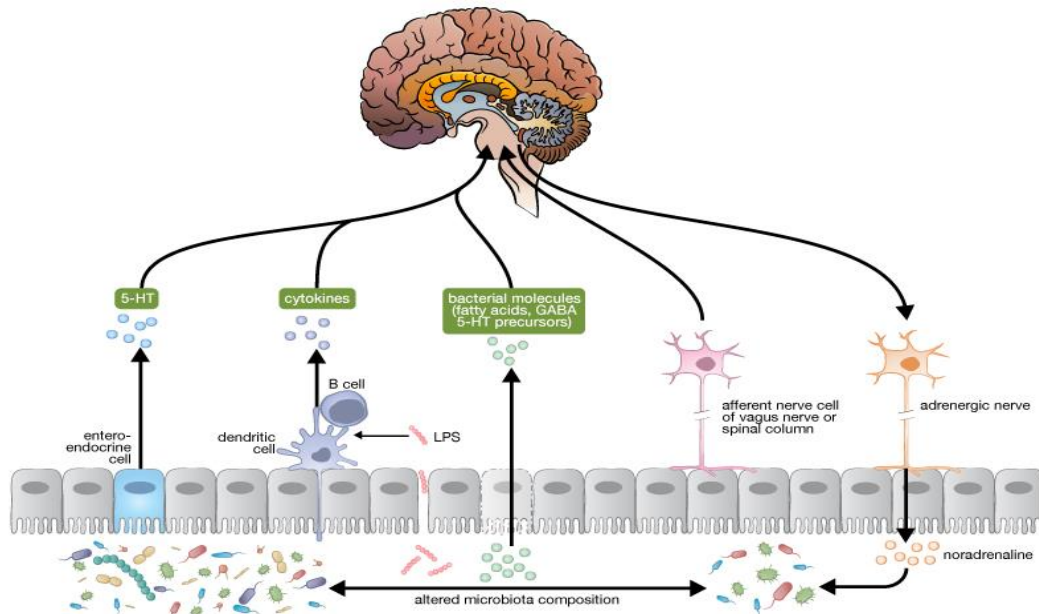


Figura 3 – Impacto das células intestinais e da MI na produção de NT (64)

A serotonina e a dopamina são dois NT essenciais na percepção da fadiga durante e após esforços extenuantes. Níveis elevados de serotonina foram encontrados em roedores e humanos fatigados, após EF intensos. 95% da serotonina corporal é produzida nas células enterocromafins intestinais, sendo que 2% do triptofano corporal é utilizado na síntese desta.

Pensa-se que o aumento da serotonina esteja associado a uma maior percepção de fadiga e sono/sonolência, enquanto a dopamina é um fator envolvido na motivação dos atletas. (4) Posto isto, comprovou-se que baixas concentrações de dopamina

juntamente com altas de serotonina, despoletam uma sensação de fadiga e cansaço durante o exercício, limitando bastante a performance. (41) Uma MI saudável tem, deste modo, influência na motivação, fadiga e estado de espírito dos atletas, podendo ser um fator a ter em conta na obtenção de melhores resultados desportivos. (5,49)

3.3 MI e diferentes tipos de AF

Os benefícios da AF na MI não são simples e lineares, dependendo consideravelmente de diversos fatores como o tipo e a intensidade do exercício e a saúde microbiana:

Relativamente ao **EF de resistência**, este pode ser definido por exercício cardiovascular (CV) prolongado no tempo, que altera a homeostase corporal. Após a sua prática, o organismo responde com a síntese de proteínas, libertação de hormonas e mudanças metabólicas, sendo considerado um tipo de EF muito benéfico para o corpo e seus sistemas. (12)

Taniguchi *et al.* estudaram os efeitos do exercício de resistência e a sua capacidade para modular a MI em idosos, ao fim de 5 semanas. Os autores concluíram que as composições microbianas apresentaram menor prevalência de *C. difficile* (uma espécie altamente prejudicial à integridade intestinal), enquanto a quantidade de espécies benéficas como *Oscillospira* aumentaram significativamente, demonstrando as vantagens do exercício de *endurance* mesmo em idades mais avançadas. (42)

Muhammad *et al.* referiram que este tipo de exercício é capaz de modular as respostas redox e imunitárias, alterar a permeabilidade e motilidade intestinal e consegue influenciar o trânsito e a consistência fecal. (6) Foi realizado um estudo em 32 pessoas adultas e sedentárias, que iniciaram a prática de exercício de resistência (30 a 60 minutos, 3 vezes por semana) durante 6 semanas, com a dieta controlada. Concluiu-se que a percentagem de determinados microrganismos e a produção de ácidos gordos de cadeia curta foi maior em pessoas com um menor IMC e em indivíduos que praticaram exercícios aeróbios (8). Curiosamente, níveis de AGCC e de bactérias que aumentaram durante o período de exercício, diminuíram, prontamente, após o estudo, evidenciando a reversibilidade dos efeitos da atividade física e, que esta, para ter efeitos na microbiota intestinal, talvez necessite de uma maior duração e regularidade. (1)

Munukka *et al.* realizaram um estudo semelhante onde pretendiam avaliar se o EF de resistência tem a capacidade de alterar a composição microbiana intestinal, em

mulheres obesas e sedentárias. Após 6 semanas de EF leve a moderado, verificou-se um acréscimo benéfico de *A. Muciniphila* (espécie mais prevalente em pessoas saudáveis e jovens) e uma redução de *Proteobacteria*. No entanto, Munukka *et al.* observaram que apenas metade da sua amostra apresentou uma resposta microbiana ao exercício de resistência. (23)

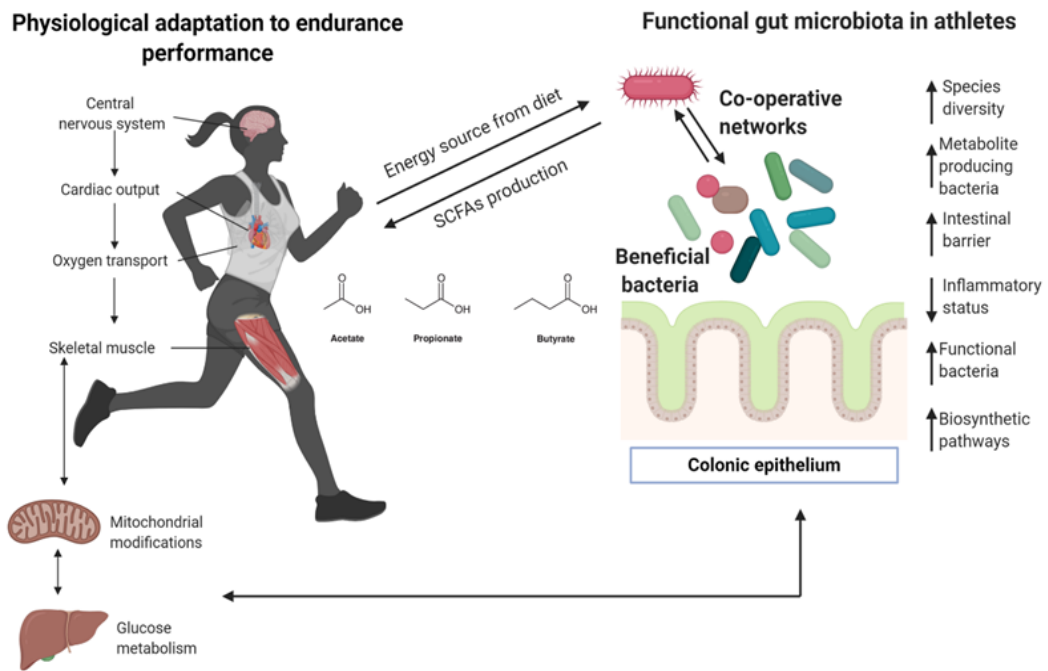


Figura 4 – Benefícios do EF de resistência nos hospedeiros (4)

Isto aponta-nos na direção do EF de resistência e moderado ter um papel essencial na composição e saúde microbiana, mas será que o mesmo se verifica no exercício de alta competição?

Uma MI saudável e funcional ajuda o atleta a tolerar novos exercícios e a superar-se, dia após dia. Por outro lado, o EF intenso e exagerado pode ter consequências indesejáveis a nível intestinal e microbiano:

- O **EF intenso e de alta competição** leva o corpo humano ao limite e, muitas vezes, os atletas à exaustão total. Estes esforços rigorosos têm consequências a todos os níveis e o TGI não é exceção. Dependendo do exercício, da idade e de outros fatores, entre 20 e 50% dos atletas sofrem de sintomas GI (35). Num estudo realizado em 29 triatletas, Jeukendrup *et al.* concluíram que 93% destes experienciaram distúrbios GI e 2 deles tiveram de desistir da prova, devido a vômitos e diarreia (36). As causas destes sintomas podem ser a hipertermia corporal, a isquemia e a hipoperfusão (devido ao desvio de fluxo sanguíneo para os músculos, coração e pulmões) que ocorrem no TGI,

durante e após o EF, e que provocam a perda da integridade das tight junctions. Posto isto, o EF intenso é um agressor que lesa as células intestinais e os seus microrganismos não são exceção:

O exercício exaustivo provou ser indutor de apoptose e de alterar a permeabilidade do TGI. (39) Karl *et al.* mostraram que treinos militares intensos resultaram em disrupção das *tight junctions* e alteração da composição da MI (aumento de taxas menos dominantes e diminuição daquelas mais prevalentes e benéficas, como *Bacteroides*). (40) Esta disrupção da barreira intestinal, juntamente com as espécies reativas de oxigénio devido à isquemia e com a libertação de endotoxinas pelas bactérias, resulta num aumento da inflamação e da permeabilidade intestinal, prejudiciais à MI e à saúde do hospedeiro. (2,8) Hsu *et al.* demonstraram que a atividade antioxidante da MI é essencial na resposta ao EF intenso e que as mudanças pró inflamatórias lesam o Sistema Imunitário (SI), colocando os atletas mais suscetíveis, por exemplo, a Infeções do Trato Respiratório (ITR), algo característico da síndrome de excesso de treino. (31)

Os lipopolissacarídeos (LPS) são toxinas nocivas que são libertadas por bactérias gram-negativas em situações de infeção, stress, dieta pobre em fibras e que são prejudiciais, pois ativam inúmeras células inflamatórias e citocinas, induzindo um estado pró-inflamatório, principalmente se atingirem a circulação sanguínea.

Num grupo de 89 maratonistas e triatletas, cujas concentrações de LPS foram analisadas, 72 apresentaram altas concentrações desta endotoxina, e 58 sofreram sintomas GI, como náuseas ou diarreia. Dos 17 que não apresentaram valores elevados de LPS, apenas 3 tiveram o mesmo quadro clínico. Isto prova que os níveis excessivos de LPS associam-se, de facto, a sintomas intestinais, à diminuição de citocinas anti-inflamatórias e que o exercício físico intenso leva ao aumento desta substância prejudicial ao hospedeiro. (38)

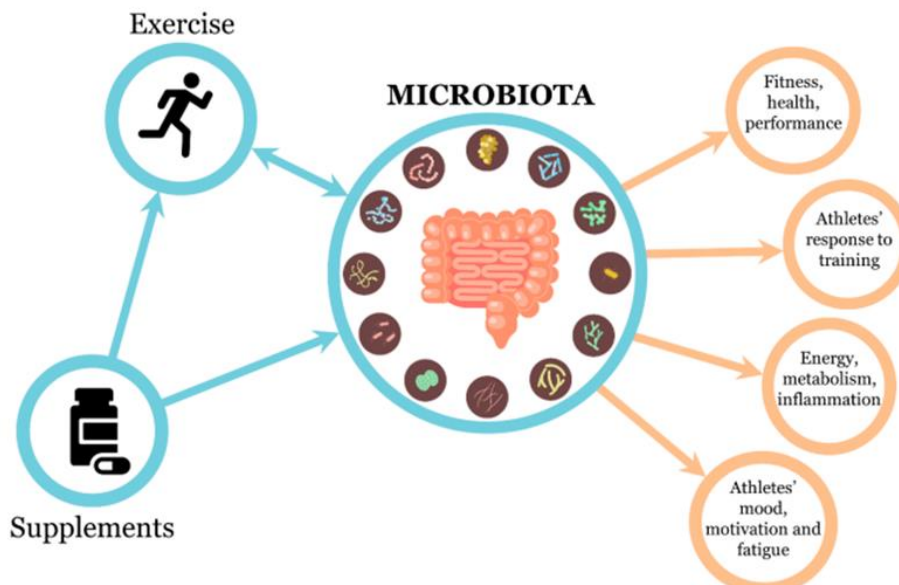


Figura 5 - Interações entre o EF, a MI e as consequências na performance desportiva (8)

Todos estes estudos demonstraram que o EF intenso e exagerado não só resulta em aumento da permeabilidade intestinal, como também pode causar imunossupressão, desequilíbrios eletrolíticos, depleção de glicogénio e stress oxidativo. Dada a importância da MI na imunidade corporal, na função GI, nos níveis de hidratação e na regulação do estado redox, não admira que os atletas de elite, cada vez mais, se interessem por formas de melhorar a sua saúde microbiana, podendo ser uma ferramenta importante na melhoria da sua performance e disponibilidade energética durante o exercício. (5,8)

3.4 AF e conseqüentes alterações taxonómicas/microbiais

A maioria dos estudos que se debruçam sobre o exercício e a microbiota intestinal focam-se nos efeitos gerais e sistémicos na saúde do hospedeiro e, raramente, mencionam diferenças taxonómicas e alterações na prevalência de diversos microrganismos, conseqüentes dessa prática. Mesmo assim, algumas investigações associam a perda de peso e o exercício a uma diminuição do ratio *F/B* e outras observaram uma correlação entre *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* com os níveis de leptina no sangue, mas acaba por ser difícil identificar que bactérias aumentam/diminuem com a AF. (6)

No geral, quase todos os estudos revelaram que a AF aumenta a diversidade da MI e que se associa a melhorias no estado de saúde. Clarke *et al.* descobriram que jogadores

profissionais de rugby apresentam maior abundância de 40 diferentes *taxa* bacterianas, comparativamente com os controles sedentários. (46)

Bressa *et al.* conduziram um estudo onde compararam composições microbianas em mulheres que iniciaram 3h de atividade física por semana com outras sedentárias. Aquelas que começaram a praticar exercício demonstraram um aumento de espécies altamente produtoras de butirato (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia hominis*) e de *A. Muciniphila*, uma espécie associada a homeostase energética e metabólica, melhorando a tolerância à glicose e diminuindo a síntese de ácidos gordos no fígado e músculo. (47)

Allen *et al.* (43) e Mika *et al.* (44) referem que o tipo de motivação para o desporto influencia a microbiota de diferentes formas: ratos que praticaram EF todos os dias, voluntariamente, desenvolveram uma estrutura microbiana mais vantajosa com a proliferação de espécies bacterianas probióticas e apresentaram um aumento na quantidade de butirato, comparativamente com os ratos sedentários ou com aqueles que realizaram EF “forçado”.

Jovens adultos com uma MI mais abundante e diversificada associam-se a espécies produtoras de AGCC e a uma maior capacidade CV e cardiorrespiratória. (17)

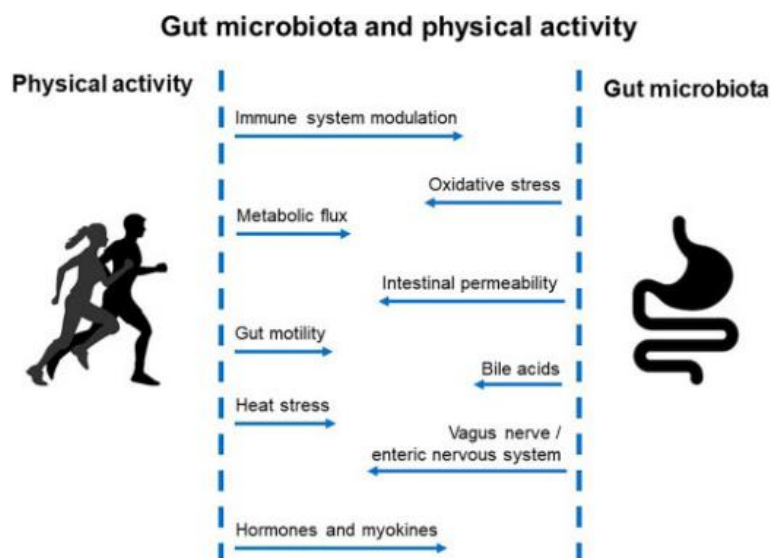


Figura 6 – Efeitos e consequências do EF na MI (51)

Como dito anteriormente, a AF induz stress térmico e reduz o fluxo sanguíneo GI, fazendo com que haja um maior contacto entre a mucosa intestinal e a microbiota. Este contacto resulta em alterações das comunidades para espécies mais resilientes que, a longo prazo, tornam a barreira intestinal mais saudável e apta para adversidades. Outro mecanismo que comprova a influência do exercício é a sua capacidade para alterar o trânsito intestinal e aumentar tanto o movimento de gases pelo TGI, como o tónus vagal. Estas alterações globais no trânsito têm impacto no pH, na secreção de muco e na disponibilidade de nutrientes para os microrganismos. Adicionalmente, o EF tem um papel fundamental na camada mucosa, impedindo a adesão e invasão de possíveis micróbios patogénicos.

Os ácidos biliares (AB) são grandes reguladores da MI e a sua ausência tem impactos negativos na variabilidade, saúde e estrutura microbiana. Posto isto, um estudo realizado em roedores hipercolesterolémicos descobriu que a AF durante 12 semanas consegue aumentar, consideravelmente, os níveis de secreção intestinal de ácidos biliares e a sua concentração nas fezes, contribuindo para a integridade das populações de microrganismos, ao contrário dos controlos sedentários. (45) Isto deixa em aberto uma possível relação entre o sedentarismo, os elevados níveis de colesterol e a diminuição da qualidade/variabilidade da MI, através deste outro mecanismo.

Por último, vários estudos concluíram que o exercício altera a expressão genética dos linfócitos intraepiteliais (que se encontram ao longo de todo o TGI), diminuindo citocinas pró-inflamatórias e aumentando enzimas antioxidantes. Sabe-se que este tipo de células coexiste de forma muito próxima com a microbiota e consegue influenciar positivamente a produção de espécies saudáveis, sendo essencial na homeostase da superfície da mucosa intestinal do hospedeiro. (1,46)

3.5 Probióticos – ajudam no EF?

Antes de abordarmos os potenciais benefícios dos **probióticos** na microbiota e na tolerância ao exercício, é importante defini-los como microrganismos não patogénicos que, quando administrados oralmente, na quantidade adequada, conferem um bom balanço microbiano no TGI, aumentando a imunidade celular do organismo e diminuindo a frequência e duração de diarreias. Em contrapartida, os prebióticos são hidratos de carbono não digeríveis (fibras) que estimulam o crescimento e a atividade

das bactérias probióticas, servindo de alimento para estas. São exemplos de prebióticos a inulina, a lactulose e diversos oligossacarídeos. A inulina é uma fibra solúvel que aumenta a quantidade de *Bifidobacterium* (um probiótico) nas fezes, que consegue aumentar a absorção de cálcio e mineralização óssea e a síntese de AGCC. (4)

Adicionalmente, os probióticos estimulam o metabolismo e proliferação celular do epitélio intestinal, diminuem a permeabilidade da barreira do intestino e participam na prevenção de distúrbios GI, do cancro do cólon e de algumas doenças digestivas, atuando contra a *H. pylori*, por exemplo. (8, 61)

As duas espécies mais conhecidas de probióticos são os ***Lactobacillus*** e as ***Bifidobacterium***. Estes estão presentes em alimentos como iogurtes ou podem ser tomados na forma de suplementos. Os *Lactobacillus* regulam a função e manutenção celular, participam no desenvolvimento do tecido linfóide, nas respostas do SI e produzem butirato através do lactato.

Messaoudi *et al.* investigaram os efeitos psicológicos da suplementação (por 30 dias) de probióticos, em humanos. Estes chegaram à conclusão de que a administração de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* resultou numa melhoria da disposição e diminuição do stress, efeitos similares aos do EF. (5,8,62) Pacientes com depressão maior que foram suplementados com *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* e *Bifidobacterium longum*, durante 8 semanas, apresentaram melhorias nos sintomas depressivos, nos comportamentos ansiosos e nas concentrações de insulina. Noutra investigação, que avaliou os efeitos dos probióticos em situações de stress, comprovou-se que dois tipos de *Lactobacillus* foram capazes de diminuir as concentrações de ACTH e aumentar as de serotonina (devido a maiores níveis de butirato e triptofano) no plasma de roedores, provando que a MI age como um órgão endócrino. (4,5). As *Bifidobacterium* associam-se fortemente à produção de AGCC, em particular, de butirato e, por isso, tem uma função importante anti-inflamatória e pró-anabólica. (4)

GASTROINTESTINAL BACTERIA

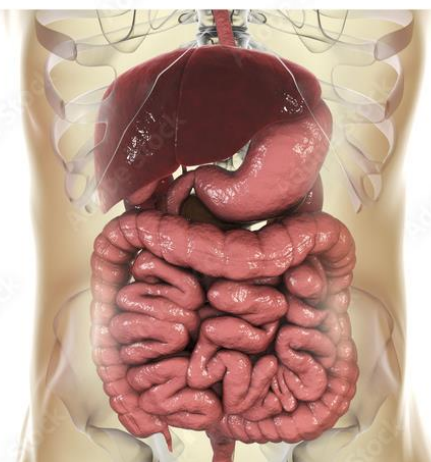
Friendly bacteria



Lactobacillus spp.



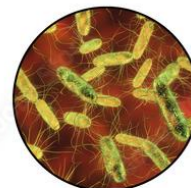
Bifidobacterium spp.



Unfriendly bacteria



Helicobacter pylori



Salmonella spp.

Figura 7 – Ilustração de probióticos e de espécies prejudiciais (65)

Relativamente à performance física, Hsu *et al.* observaram que a suplementação com probióticos melhorou a resistência ao exercício, principalmente, aeróbio. Neste estudo, também foram observadas melhorias dos indicadores hepáticos, do sistema antioxidante e diminuição da massa gorda. (6,63) Noutro estudo, provou-se que a administração de *Lactobacillus reuteri*, em ratos com caquexia, resultou num aumento da massa e tamanho das fibras musculares e diminuição de marcadores de atrofia muscular, com uma maior expressão de cadeias respiratórias mitocondriais. (4)

Nos idosos, residentes num lar, submetidos a suplementação probiótica observou-se um aumento da Velocidade da Marcha (VM) e melhoria do “up-and-go test”, indicando a importância dos probióticos e de uma MI saudável nestas idades. (4)

Com isto, podemos concluir que uma possível terapia e auxílio para a saúde microbiana é a suplementação com probióticos ou o maior consumo de prebióticos, pois estes estimulam o crescimento bacteriano, têm ação anti-inflamatória e ajudam na reparação e proliferação do epitélio intestinal, principalmente, após lesão ou stress. Os probióticos têm também um papel importante na aptidão física e, em idades mais avançadas, conseguem melhorar a capacidade funcional.

3.6 Papel do EF e da MI na proteção e prevenção de doenças intestinais

É consensualmente aceite o papel do exercício regular como fator protetor de muitas doenças crônicas, com as respetivas consequências de morbi-mortalidade e qualidade de vida.

Durante décadas, a explicação para tais benefícios foi procurada nas interações diretamente exercidas pelo exercício nas várias células, órgãos e sistemas do organismo. A recente explosão de conhecimentos sobre a microbiota intestinal, levou a conhecer um conjunto de produtos por ela produzidos que variam com as espécies microbianas que a constituem. Desde então, através da sua ação local ou sistémica (após entrarem em circulação), começaram a estabelecer-se associações de causa-efeito entre estas substâncias e vários dos benefícios do exercício físico, que previamente eram apenas atribuídos aos seus efeitos diretos. Tais efeitos resultariam numa modulação benéfica da microbiota intestinal pelo exercício regular com consequente melhoria no prognóstico de diversas patologias, incluindo as patologias intestinais:

Estudos observacionais concluíram que indivíduos que praticam EF regularmente têm 24% de menor probabilidade de vir a ter um **Cancro Colorretal** (CCR). (53) Aliás, mesmo após o diagnóstico de CCR, o início da prática de EF, moderado e adaptado, consegue modular a doença e melhorar a qualidade de vida, reduzindo a mortalidade a curto prazo. (1) Uma das explicações é a produção de butirato e a sua capacidade para, como já referido, conseguir regular as vias de morte celular e inibir a expressão de oncogenes. Isto resulta numa diminuição do tamanho tumoral e numa incapacidade deste se alastrar e metastizar, diminuindo as complicações locais e sistémicas da doença. (54)

No que respeita às **doenças inflamatórias intestinais** (DII), tanto a **colite ulcerosa** (CU) como a **doença de crohn** (DC), são caracterizadas por uma resposta imunitária inadequada/exagerada e por uma microbiota modificada. Pacientes com estas doenças possuem grande quantidade de *Enterobacteriaceae* e pouca abundância de *Roseburia*, uma espécie conhecida pela sua produção de AGCC e por controlar a formação de células T reguladoras (importantes moduladoras do SI, promovendo tolerância a autoantígenos e, que, por isso, previnem doenças autoimunes).(55)

O início da prática de AF nestes doentes resultou numa diminuição de 22% do risco de ter uma CU na fase ativa e num aumento da qualidade de vida, mesmo que, em fase ativa. O mecanismo, por trás destes benefícios, parece passar pelos efeitos anti-inflamatórios do EF e dos AGCC que atenuam o estado pró-inflamatório intestinal. (1)

3.7 Papel do EF e da MI na proteção e prevenção de outras doenças

Os efeitos benéficos do EF e da MI não se limitam às doenças intestinais, podendo ter uma ação importante na prevenção e prognóstico de múltiplas doenças como é o caso das **doenças metabólicas** como, por exemplo, a **obesidade**. A obesidade é a consequência de uma alteração crónica da dieta e estilo de vida que resulta em acumulação de tecido adiposo e, conseqüente, aumento do peso. O perfil metabólico, a microbiota fecal e o nível de aptidão física de sujeitos obesos são totalmente diferentes de sujeitos com o índice de massa corporal (IMC) normal. (6)

Variados estudos correlacionam a microbiota com este tipo de patologias, pois esta vai-se moldando ao estilo de vida (EV) do seu hospedeiro: a microbiota de indivíduos obesos é muito menos diversa e possui uma maior capacidade de armazenar energia da dieta. Para além disso, estes indivíduos possuem grandes alterações nas vilosidades e maior permeabilidade intestinal, devido à diminuição de ZO-1 e de ocludina, resultando em endotoxemia e conseqüente ganho de peso, alterações que se associam a DCNT. (6,9,56)

Queipo-Ortuno *et al.* descobriram que com apenas 6 dias de AF, roedores viram o número de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* aumentar, juntamente com os níveis de leptina no soro. (57) Num estudo realizado por Lai *et al.*, ratos obesos e sob dieta hipercalórica que receberam um transplante fecal de ratos ativos e magros, viram os seus níveis de citocinas inflamatórias diminuírem, perderam peso e demonstraram melhores valores de glicose em jejum, revelando o poder e influência da MI neste tipo de disfunções metabólicas. (9,58) Feng *et al.* observou que nos roedores com síndrome metabólico, o exercício retificou respostas inflamatórias, aumentou a variabilidade da MI e aumentou a densidade de *Bacteroides*, *Flavobacterium* e *Parabacteroides*, espécies conhecidas por prevenirem esteatose hepática e ganho de peso. (6,60) A AF aumenta, também, a quantidade nas fezes de metabolitos de arabinose e carnosina, ambos candidatos promissores para tratamento da obesidade e DMII.

Relativamente às **doenças mentais**, são consensualmente aceites os benefícios da AF nos níveis de bem-estar e atenção das pessoas. A MI também parece estar envolvida na cognição e bem-estar, devido ao eixo cérebro-intestino. Como referido anteriormente, diversas espécies bacterianas produzem dopamina, serotonina e GABA, neurotransmissores envolvidos na génese de doenças como a depressão e a ansiedade:

Atividade Física e Microbiota Intestinal

baixos níveis de serotonina estão ligados à depressão e o GABA tem efeitos ansiolíticos e relaxantes. Não há dúvida que a MI, podendo alterar a síntese e liberação destas moléculas, tem um papel essencial no tratamento e prevenção deste tipo de perturbações, não devendo ser ignorada. (1,59)

Folha em branco

Conclusão

A microbiota é um conjunto de MO que habita um ecossistema e está presente em diversas superfícies do corpo humano, desde a pele e da boca ao estômago e ao trato genitourinário. No entanto, apesar destas terem funções importantes dentro de cada habitat, a maior parte da biomassa microbiana do nosso corpo encontra-se na microbiota do TGI (70%) e, em particular, no intestino (porque o ambiente ácido do estômago e duodeno não permitem crescimento bacteriano), fazendo com que a Microbiota Intestinal (MI) seja a microbiota com maior influência e relevância na saúde do hospedeiro.

A variabilidade interpessoal da MI é enorme, tornando-se difícil definir que espécies é que a constituem. Apesar disso, sabe-se que, mesmo com espécies distintas, as funções da microbiota são constantes e similares em diferentes pessoas. Podemos, desta forma, concluir que há um núcleo funcional essencial no desempenho microbiano do intestino.

Devido a esta grande influência da MI na saúde do hospedeiro, pode-se presumir que quando esta é alterada ou perturbada por agentes endógenos ou exógenos (um processo conhecido por disbiose), o hospedeiro vai sofrer consequências negativas, resultando em possíveis patologias de novo ou exacerbações daquelas já instaladas.

Como abordado anteriormente, a dieta e o EF são os principais moduladores da MI e os seus benefícios demonstraram ser mais eficazes quando atuam em conjunto, significando que têm uma relação simbiótica e conseguem intensificar os efeitos um do outro. Isto prova que pessoas e atletas, que pratiquem AF regularmente, tirarão mais proveito dessa prática se adicionarem o hábito de uma alimentação saudável, equilibrada e ajustada ao seu contexto.

Relativamente ao EF, este provou ser, sem dúvida, uma grande mais-valia para a saúde e bom funcionamento intestinal, desde que, em quantidades moderadas, sem levar o corpo a esforços exagerados. O EF é conhecido por ter benefícios CV, no controlo da homeostase energética e, sobretudo, na prevenção de DCNT, conseguindo diminuir os valores de TGL, de colesterol e aumentar a sensibilidade à insulina. As suas ações na MI são variadas e passam pelo aumento da variabilidade microbiana, da produção de AGCC (metabolitos essenciais no funcionamento da microbiota e na saúde do hospedeiro) e pela diminuição do número de espécies bacterianas prejudiciais e o aumento daquelas benéficas.

Adicionalmente, o exercício moderado é capaz de alterar o trânsito intestinal, de aumentar a resiliência das células epiteliais do intestino, melhorando as “tight junctions” e de diminuir a permeabilidade intestinal, efeito que adquire uma maior importância com o envelhecimento das células. Para além disso, o EF modula as respostas redox e imunitárias intestinais, possuindo um papel anti-inflamatório, inibindo citocinas e células pró-inflamatórias.

Por outro lado, o exercício consegue ser prejudicial para a MI se for praticado em excesso. Este EF exaustivo diminui o aporte sanguíneo intestinal e coloca o epitélio numa situação de stress oxidativo, que resulta no aumento de espécies reativas de oxigénio e de apoptose celular. Sintomas como vómitos e diarreia também podem ser consequências da prática deste tipo de exercício, devido à disrupção da função de barreira intestinal, sendo muito comuns nos atletas de alta competição.

Com isto, podemos concluir que atletas com uma melhor apresentação e saúde microbiótica sofrerão de menos sintomas GI e terão uma melhor resposta após exercícios extenuantes. A relação do EF com a MI não é unidirecional e a MI também tem influência na resposta ao EF, através da libertação de moléculas pró-anabólicas que ajudam no ganho de massa muscular ou na libertação de NT. Comprovou-se que a MI tem a habilidade de controlar a produção de serotonina e dopamina e estes NT estão envolvidos na perceção de fadiga e na motivação durante e após a prática de AF. Isto leva-nos a concluir que uma MI estável e saudável pode ajudar os atletas, e não só, na sua resistência e aptidão física.

Por isso, os probióticos (espécies de MO benéficos para a MI) têm um papel muito importante no futuro, pois provou-se que estes suplementos melhoram a resistência aos esforços físicos e conseguem aumentar a performance desportiva, apenas modificando o perfil microbiótico intestinal.

De facto, o EF comprovou ter um efeito tão positivo na microbiota e saúde intestinal que consegue prevenir e diminuir a prevalência de doenças intestinais como o cancro colorretal e diminuir as complicações das duas doenças intestinais inflamatórias, a colite ulcerosa e a doença de Crohn.

Finalizando e tendo em conta os artigos lidos e analisados, cruzando informações entre eles, podemos responder à pergunta chave desta dissertação: “A atividade física relaciona-se com a microbiota intestinal?”. A resposta para esta questão é, indubitavelmente, SIM. Há inúmeras evidências que correlacionam estas duas variáveis, sendo a relação bidirecional e simbiótica, pois a AF melhora a saúde e funcionalidade da microbiota e a MI consegue influenciar e melhorar a aptidão física.

Atividade Física e Microbiota Intestinal

No entanto, este tema e, em particular, a microbiota intestinal é um tópico que apenas recentemente se transformou num sólido e recorrente objeto de estudo. Cada vez mais, a MI é o foco de análise de pessoas que procuram ser saudáveis ou que querem melhorar a sua condição física, podendo ser considerado o “órgão da moda”. Ainda há muitas funções por descobrir e microrganismos por explorar, neste universo paralelo que é a microbiota intestinal.

Folha em bran

Referências bibliográficas

1. Mailing LJ, Allen JM, Buford TW, Fields CJ, Woods JA. Exercise and the Gut Microbiome: A Review of the Evidence, Potential Mechanisms, and Implications for Human Health [Internet]. Vol. 47, Exercise and Sport Sciences Reviews. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2019. p. 75–85
2. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome [Internet]. Vol. 8, Genome Medicine. Springer Science and Business Media LLC; 2016.
3. Davenport ER, Sanders JG, Song SJ, Amato KR, Clark AG, Knight R. The human microbiome in evolution [Internet]. Vol. 15, BMC Biology. Springer Science and Business Media LLC; 2017.
4. Ticinesi A, Nouvenne A, Cerundolo N, Catania P, Prati B, Tana C, et al. Gut Microbiota, Muscle Mass and Function in Aging: A Focus on Physical Frailty and Sarcopenia [Internet]. Vol. 11, Nutrients. MDPI AG; 2019. p. 1633.
5. Clark A, Mach N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes [Internet]. Vol. 13, Journal of the International Society of Sports Nutrition. Informa UK Limited; 2016.
6. Sohail MU, Yassine HM, Sohail A, Thani AAA. Impact of Physical Exercise on Gut Microbiome, Inflammation, and the Pathobiology of Metabolic Disorders [Internet]. Vol. 15, Review of Diabetic Studies. JCFCorp SG PTE LTD; 2019. p. 35–48.
7. Ponziani FR, Picca A, Marzetti E, Calvani R, Conta G, Del Chierico F, et al. Characterization of the gut-liver-muscle axis in cirrhotic patients with sarcopenia [Internet]. Vol. 41, Liver International. Wiley; 2021. p. 1320–34.
8. Donati Zeppa S, Agostini D, Gervasi M, Annibalini G, Amatori S, Ferrini F, et al. Mutual Interactions among Exercise, Sport Supplements and Microbiota [Internet]. Vol. 12, Nutrients. MDPI AG; 2019. p. 17.
9. Chen J, Guo Y, Gui Y, Xu D. Physical exercise, gut, gut microbiota, and atherosclerotic cardiovascular diseases [Internet]. Vol. 17, Lipids in Health and Disease. Springer Science and Business Media LLC; 2018.
10. Xia WJ, Xu ML, Yu XJ, Du MM, Li XH, Yang T, et al. Antihypertensive effects of exercise involve reshaping of gut microbiota and improvement of gut-brain axis

- in spontaneously hypertensive rat [Internet]. Vol. 13, Gut Microbes. Informa UK Limited; 2020. p. 1–24.
11. Muralidharan J, Moreno-Indias I, Bulló M, Lopez JV, Corella D, Castañer O, et al. Effect on gut microbiota of a 1-y lifestyle intervention with Mediterranean diet compared with energy-reduced Mediterranean diet and physical activity promotion: PREDIMED-Plus Study [Internet]. Vol. 114, The American Journal of Clinical Nutrition. Elsevier BV; 2021. p. 1148–58.
 12. Campaniello D, Corbo MR, Sinigaglia M, Speranza B, Racioppo A, Altieri C, et al. How Diet and Physical Activity Modulate Gut Microbiota: Evidence, and Perspectives [Internet]. Vol. 14, Nutrients. MDPI AG; 2022. p. 2456.
 13. Afzaal, M., Saeed, F., Shah, Y. A., Hussain, M., Rabail, R., Socol, C. T., Hassoun, A., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., Rusu, A. V., & Aadil, R. M. (2022). Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media SA.
 14. Shafquat A, Joice R, Simmons SL, Huttenhower C. Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends Microbiol.* 2014;22:261–6
 15. Chen HM, Liu XW, Sun RJ, Fang JY. A survey on the developmental intestinal microbiota research in China: The history, funding, and frontiers of gut bacteria. *J Dig Dis.* 2015;16:421–30.
 16. Lynch, C.J.; Adams, S.H. Branched-chain amino acids in metabolic signaling and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014, 10, 723–736.
 17. Estaki M, Pither J, Baumeister P, Little JP, Gill SK, Ghosh S, Ahmadi-Vand Z, Marsden KR, Gibson DL. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome* 2016. 4(1):42.
 18. Torres A. Mau funcionamento intestinal E aumento do risco de diabetes [Internet]. ANDREIA TORRES. ANDREIA TORRES; 2022 [cited 2023Jan13]. Available from: <https://andreiatorres.com/blog/2020/3/4/disbiose-intestinal-e-diabetes>
 19. Fasano A. Leaky gut and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;42:71–8.

20. Taxon [Internet]. Taxon - WikiCiências. [cited 2023Jan16]. Available from: <https://wikiciencias.casadasciencias.org/wiki/index.php/Taxon>
21. Almeida S. Filo [Internet]. Knoow. [cited 2023Jan16]. Available from: <https://knoow.net/ciencterravida/biologia/filo/>
22. Lowder T, Padgett DA, Woods JA. Moderate exercise early after influenza virus infection reduces the Th1 inflammatory response in lungs of mice. *Exerc Immunol Rev* 2006. 12:97-111.
23. Munukka E, Ahtiainen JP, Puigbó P, et al. Six-week endurance exercise alters gut metagenome that is not reflected in systemic metabolism in over-weight women. *Front. Microbiol.* 2018; 9.
24. Campbell, S.C.; Wisniewski, P.J.; Noji, M.; McGuinness, L.R.; Häggblom, M.M.; Lightfoot, S.A.; Joseph, L.B.; Kerkhof, L.J. The Effect of Diet and Exercise on Intestinal Integrity and Microbial Diversity in Mice. *PLoS ONE* 2016, 11, e0150502.
25. BiomeHub. Conhecendo as Bactérias da microbiota intestinal [Internet]. BiomeHub. BiomeHub; 2023 [cited 2023Jan23]. Available from: <https://www.biome-hub.com/post/conhecendo-as-bact%C3%A9rias-da-microbiota-intestinal>
26. Seedorf H, Griffin NW, Ridaura VK, Reyes A, Cheng J, Rey FE, et al. Bacteria from diverse habitats colonize and compete in the mouse gut. *Cell.* 2014;159:253–66
27. Mach N and Fuster-Botella D: Endurance exercise and gut microbiota: A review. *J Sport Health Sci* 2016
28. Martins AS, Crescenzi A, Stern JE, et al. Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension.* 2005;46:1004–9.
29. Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009;6:306–14
30. Holzer P, Farzi A. Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv Exp Med Biol.* 2014;817:195–219.

31. Hsu YC, Chen HI, Kuo YM, et al. Chronic treadmill running in normotensive rats resets the resting blood pressure to lower levels by upregulating the hypothalamic gabaergic system. *J Hypertens.* 2011;29:2339–48
32. Ramson R, Jurimae J, Jurimae T, et al. The effect of 4-week training period on plasma neuropeptide y, leptin and ghrelin responses in male rowers. *Eur J Appl Physiol.* 2012;112:1873–80.
33. Heijnen S, Hommel B, Kibele A, et al. Neuromodulation of aerobic exercise-a review. *Front Psychol.* 2015;6:1890.
34. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, et al. Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol.* 2014;28:1221–38.
35. Lamprecht M, Bogner S, Schippinger G, et al. Probiotic supplementation affects markers of intestinal barrier, oxidation, and inflammation in trained men; a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr.* 2012;9:45.
36. Jeukendrup AE, Vet-Joop K, Sturk A, et al. Relationship between gastrointestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. *Clin Sci (Lond).* 2000;98:47–55
37. Moraes ACFde, Silva ITda, Almeida-Pititto Bde, Ferreira SRG. Microbiota intestinal E RISCO CARDIOMETABÓLICO: Mecanismos E Modulação Dietética [Internet]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2014 [cited 2023Jan24]. Available from: <https://www.scielo.br/j/abem/a/SGBSN5QjMxhM68xg6sbgcfJ/?lang=pt>
38. Lambert JE, Myslicki JP, Bomhof MR, et al. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2015;40:749–52.
39. Gutekunst, K.; Kruger, K.; August, C.; Diener, M.; Mooren, F.C. Acute exercises induce disorders of the gastrointestinal integrity in a murine model. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2014, 114, 609–617
40. Karl, J.P.; Margolis, L.M.; Murphy, N.E.; Carrigan, C.T.; Castellani, J.W.; Madslie, E.H.; Teien, H.K.; Martini, S.; Montain, S.J.; Pasiakos, S.M. Military training elicits marked increases in plasma metabolomic signatures of energy

- metabolism, lipolysis, fatty acid oxidation, and ketogenesis. *Physiol. Rep.* 2017; 5.
41. Bailey, S.P.; Davis, J.M.; Ahlborn, E.N. Serotonergic agonists and antagonists affect endurance performance in the rat. *Int. J. Sports Med.* 1993, 14, 330–333.
 42. Taniguchi H., Tanisawa K., Sun X., Kubo T., Hoshino Y., Hosokawa M., Takeyama H., Higuchi M. Effects of short-term endurance exercise on gut microbiota in elderly men. *Physiol. Rep.* 2018;6:e13935
 43. Allen JM, Berg Miller ME, Pence BD, Whitlock K, Nehra V, Gaskins HR, White BA, Fryer JD, Woods JA. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* 2015. 118(8):1059-1066
 44. Mika A., Treuren W.V., González A., Herrera J.J., Knight R., Fleshne M. Exercise is more effective at altering gut microbial composition and producing stable changes in lean mass in juvenile versus adult male F344 rats. *PLoS ONE.* 2015;10:e0125889
 45. Meissner M, Lombardo E, Havinga R, Tietge UJ, Kuipers F, Groen AK. Voluntary wheel running increases bile acid as well as cholesterol excretion and decreases atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis.* 2011; 218(2):32
 46. Ismail AS, Severson KM, Vaishnava S, et al. Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108(21):8743–8.
 46. Clarke SF, Murphy EF, O’Sullivan O, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut.* 2014; 63(12):1913–20
 47. Cheng D, Xie MZ. A review of a potential and promising probiotic candidate—*Akkermansia muciniphila* [Internet]. Vol. 130, *Journal of Applied Microbiology.* Oxford University Press (OUP); 2020. p. 1813–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14911>
 48. Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 2012; 6(2):320–9
 49. Eisenstein M. Microbiome: Bacterial broadband. *Nature.* 2016;533:104–6

50. Matsumoto M, Inoue R, Tsukahara T, et al. Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008; 72(2):572–6.
51. Pedersini P, Turrone S, Villafañe JH. Gut microbiota and physical activity: Is there an evidence-based link? [Internet]. Vol. 727, *Science of The Total Environment*. Elsevier BV; 2020. p. 138648. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138648>
52. Bello A. Como O Exercício modula a microbiota [Internet]. Annie Bello Phd. 2022 [cited 2023Jan27]. Available from: <https://escolanbe.anniebello.com.br/artigos-publicacoes/como-o-exercicio-modula-a-microbiota/>
53. Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee I-M. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br. J. Cancer.* 2009; 100(4):611–6.
54. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol. Cell.* 2012; 48(4):612–26.
55. Basterfield L, Mathers JC. Intestinal tumours, colonic butyrate and sleep in exercised Min mice. *Br. J. Nutr.* 2010; 104(3):355–63.
56. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006; 444:1027–31.
57. Queipo-Ortuño MI, Seoane LM, Murri M, et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS One.* 2013; 8(5):e65465.
58. Lai Z-L, Tseng C-H, Ho HJ, et al. Fecal microbiota transplantation confers beneficial metabolic effects of diet and exercise on diet-induced obese mice. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):15625.
59. Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome brain-gut axis communication. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 81
60. Feng X, Uchida Y, Koch L, Britton S, Hu J, Lutrin D, Maze M. Exercise prevents enhanced postoperative neuroinflammation and cognitive decline and rectifies the gut microbiome in a rat model of metabolic syndrome. *Front Immunol* 2017. 8:1768.

61. Zanin T. Probióticos: O que são, para que servem e Como Tomar [Internet]. Tua Saúde. Tua Saúde; 2022 [cited 2023Jan31]. Available from: <https://www.tuasaude.com/o-que-sao-os-probioticos/>
62. Messaoudi, M.; Lalonde, R.; Violle, N.; Javelot, H.; Desor, D.; Nejdi, A.; Bisson, J.F.; Rougeot, C.; Pichelin, M.; Cazaubiel, M.; et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br. J. Nutr.* 2011, 105, 755–764.
63. Hsu YJ, Chiu CC, Li YP, Huang WC, Te Huang Y, Huang CC, Chuang HL. Effect of intestinal microbiota on exercise performance
64. Torres A. A Complexa Relação Entre Cérebro e intestino [Internet]. ANDREIA TORRES. ANDREIA TORRES; 2022 [cited 2023Feb2]. Available from: <https://andreiatorres.com/blog/2017/cerebrointestino>
65. Friendly and unfriendly gastrointestinal bacteria, 3D illustration. good, lactobacillus and Bifidobacterium, and bad, helicobacter pylori and shigella dysenteriae, gut bacteria. human microbiome stock illustration [Internet]. Adobe Stock. [cited 2023Feb2].