



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# “O segundo cérebro”: da microbiota entérica à saúde cerebral

**Carla Sofia Lopes Salgueiro**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Graça Maria Fernandes Baltazar

**Covilhã, maio de 2019**



## Agradecimentos

Aos meus pais e irmãs por todo o apoio, dedicação, força, ajuda e amor que me deram não só durante a realização desta dissertação, mas também ao longo de toda a minha vida.

Ao meu afilhado por ser a minha fonte de alegria.

Às minhas amigas e colegas, por toda a amizade, paciência e parceria.

Uma última palavra de agradecimento à Doutora Graça Baltazar, pela disponibilidade, simpatia e preocupação. E pela preciosa ajuda na elaboração desta dissertação.



## Resumo

A relação entre o sistema nervoso e a microbiota entérica é um tópico que tem gerado bastante atenção no campo das neurociências. A microbiota entérica corresponde ao conjunto de microrganismos que habitam o trato digestivo dos animais. A colonização intestinal ocorre, na grande maioria, durante a passagem do bebê pelo canal do parto, onde é exposto à microbiota da mãe. Assim, a constituição da microbiota entérica varia consoante o tipo de parto e consoante fatores como o modo de amamentação, o genótipo, o país e região do hospedeiro, o uso de antibióticos, prebióticos e probióticos. A microbiota entérica nos primeiros dias de vida é pouco diversificada e instável; atingindo a idade adulta ela mantém-se relativamente estável ao longo do tempo e torna-se única e característica de cada indivíduo. Quando o hospedeiro é exposto a agentes externos como as alterações da dieta ou o uso de antibióticos a microbiota entérica, que se encontra em simbiose com o hospedeiro, sofre alterações. Contudo, ela apresenta uma grande capacidade de resistir e restaurar o seu núcleo microbiano. Apesar da resiliência da microbiota, esta pode sofrer um fenómeno de disbiose, que por sua vez, se correlaciona com a elevada prevalência de patologias crónicas e neurodegenerativas, no hospedeiro.

Em particular, a microbiota entérica estabelece uma relação bidirecional com o sistema nervoso central (SNC). Este dinamismo implica efeitos em diversos mecanismos, como a alteração da permeabilidade intestinal, que permite a passagem de microrganismos e dos seus metabolitos neuroativos para a corrente sanguínea que irão modular o SNC, e a modulação do nervo vago e do eixo hipotálamo-hipófise.

Neste sentido, a microbiota entérica influencia o desenvolvimento e a manutenção do equilíbrio dos órgãos e tecidos e o seu papel é importante na manutenção da saúde cerebral, pois através das vias neuro-endócrinas e imunológicas este ecossistema desencadeia a modulação do sistema nervoso. Por este motivo têm emergido trabalhos centrados no estudo do impacto da microbiota entérica na saúde neurológica através de estudos quer em modelos pré-clínicos quer em humanos. Nestes estudos a microbiota entérica é manipulada através da administração de probióticos, prebióticos ou antibióticos. Modelos animal livres de germes são frequentemente usados neste tipo de estudos.

Alguns destes estudos permitiram concluir que a disbiose entérica, provocada pela administração de antibióticos ou pela infeção entérica, propicia comportamentos de ansiedade em modelos animais. Paralelamente verificou-se que os animais livres de germes se apresentam menos ansiosos quando sujeitos a estímulo indutor de stresse, apesar de terem um elevado nível de corticosterona e de Hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e défices na memória não-espacial e na memória de trabalho. Relativamente à doença de Parkinson,

alguns autores verificaram que o risco de desenvolver esta patologia é inferior nos pacientes submetidos a vagotomia total, sugerindo uma atuação do nervo vago na patogénese do Parkinson; outros comprovaram existir um agravamento dos sintomas motores com a disbiose entérica.

Resultados de alguns trabalhos sugerem também a existência de uma correlação entre a disbiose entérica e a progressão da doença de Alzheimer.

## **Palavras-chave**

Microbiota entérica; saúde cerebral; disbiose entérica; distúrbios neurodegenerativos.

## Abstract

The relationship between the nervous system and the enteric microbiota is a topic that has generated a lot of attention in the field of neurosciences. The enteric microbiota corresponds to the set of microorganisms that colonize the digestive tract of the animals. Most intestinal colonization occurs during the passage of the baby through the birth canal, where it is exposed to the mother's microbiota. Thus, the constitution of the enteric microbiota varies according to the type of delivery and depending on factors such as the mode of breastfeeding, the genotype, the host country and region, the use of antibiotics, prebiotics and probiotics. The enteric microbiota in the first days of life is little diversified and unstable; reaching adulthood it remains stable over time and becomes unique and characteristic of each individual.

When the host is exposed to external agents such as diet changes or the use of antibiotics, the enteric microbiota, which is in symbiosis with the host, undergoes changes in its dynamism. However, it has a great ability to resist and restore its microbial nucleus. Despite the resilience of the microbiota, it can undergo a phenomenon of dysbiosis, which in turn, correlates with the high prevalence of chronic and neurodegenerative pathologies in the host.

In particular, the enteric microbiota establishes a bidirectional relationship with the central nervous system (CNS). This dynamism involves several mechanisms, from the change in intestinal permeability, that allows the passage of microorganisms and their neuroactive metabolites to the bloodstream that will modulate the CNS, to the modulation of the action of the vagus nerve and the hypothalamic-pituitary axis.

In this sense, the enteric microbiota influences the development and maintenance of the balance of organs and tissues and their role is important in maintaining cerebral health, since through the neuro-endocrine and immunological pathways this ecosystem modulates the nervous system. For this reason, research has been focused on the study of the impact of the enteric microbiota on neurological health through the use of preclinical models and also of studies in humans. In these studies, the enteric microbiota is manipulated through the administration of probiotics, prebiotics or antibiotics. Germ-free animal model is also frequently used in these investigations.

Some of these studies allowed us to conclude that enteric dysbiosis, caused by the administration of antibiotics or by enteric infection, leads to anxious behaviours in conventional animals. At the same time, it was found that the germ-free animals are less anxious, despite having high level of corticosterone and ACTH and non-spatial deficits in spatial memory and working memory. Concerning Parkinson's disease, some authors found that the risk of developing the disease is lower in patients undergoing total vagotomy,

suggesting a role of the vagus nerve role in the Parkinson's disease pathogenesis; others showed a correlation between the worsening of motor symptoms and enteric dysbiosis.

Finally, some data, although scarce, point to the existence of a correlation between enteric dysbiosis and the progression of Alzheimer's disease.

## Keywords

Enteric microbiota; mental health; enteric dysbiosis; neurodegenerative disorders.

# Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Acrónimos	xv
Introdução	1
Metodologia	3
1. A microbiota entérica	5
1.1. O desenvolvimento da microbiota entérica	5
1.2. Funções da microbiota entérica	6
2. Como se estuda o papel da microbiota entérica na saúde humana?	9
2.1. Probióticos e prebióticos	9
2.2. Antibióticos	12
2.3. Estudos de infeção	12
2.4. Modelo animal livre de germes	13
3. O eixo microbiota entérica-intestino-cérebro	15
3.1. Mecanismos de ação	15
3.1.1. Barreira intestinal e sua permeabilidade	15
3.1.2. Metabolitos bacterianos e neurotransmissores	16
3.1.3. Atuação do nervo vago	18
3.1.4. Eixo hipotálamo-hipófise	19
4. A microbiota entérica e a doença neurológica	21
4.1. A microbiota entérica e as alterações comportamentais e cognitivas	21
4.2. A microbiota entérica e a doença de Parkinson	24
4.3. A microbiota entérica e a doença de Alzheimer	26
Conclusão	29
Bibliografia	31
Anexos	39
Anexo I - Tabela resumo dos resultados obtidos na avaliação das implicações da microbiota entérica nas alterações comportamentais e cognitivas de animais de laboratório.	39
Anexo II - Tabela resumo dos resultados obtidos na avaliação das implicações da microbiota entérica na doença de Parkinson.	40
Anexo III - Tabela resumo dos resultados obtidos na avaliação das implicações da microbiota entérica na doença de Alzheimer.	41



## Lista de Figuras

Figura 1- Modelo de manipulação da microbiota num animal gnotobiótico livre de germes: Inoculação de um único microrganismo (A) - animal monoxênico; inoculação de dois microrganismos (A+B) - animal dixênico; inoculação da microbiota definida “Schaedler flora”. .....	14
Figura 2 - Modelo de manipulação da microbiota num modelo não-gnotobiótico: Inoculação de microbiota humana em simbiose e em disbiose em animais livres de germes permitem criar uma condição “human-like”. .....	14
Figura 3 - Mecanismos envolvidos na comunicação bidirecional do eixo intestino-cérebro (adaptado de Cryan e Dinan, 2012).....	20
Figura 4- O eixo microbiota entérica-intestino-cérebro num doente parkinsoniano com e sem a administração de probióticos. (A) Correlação entre a disbiose entérica presente num doente parkinsoniano e a prevalência dos sintomas não motores da doença; (B) Melhoria dos sintomas não motores após terapêutica probiótica (82). .....	25



## Lista de tabelas

Tabela 1- Grupos de microrganismos presentes na microbiota entérica.....	5
Tabela 2 - Tipologia, definição e benefícios dos bióticos utilizados em estudos de avaliação da função da microbiota entérica na saúde humana. ....	11
Tabela 3- Tipos de metabolitos libertados por determinados microrganismos e suas ações. ...	17



## Lista de Acrónimos

TGI	Trato gastrointestinal
AGCCs	Ácidos gordos de cadeia curta
SNC	Sistema nervoso central
GABA	Ácido gama-aminobutírico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês “Brain derived neurotrophic factor”
SNA	Sistema nervoso autónomo
SNE	Sistema nervoso entérico
LPS	Lipopolissacarídeos
CRF	Corticotrofina, do inglês “Corticotropin releasing factor”
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica, do inglês “Adrenocorticotropic hormone”



## Introdução

A microbiota entérica é um ecossistema formado por múltiplos microrganismos que habitam o trato gastrointestinal (TGI) de um hospedeiro, estabelecendo uma relação bidirecional de simbiose com o mesmo (4).

Por exercer um papel fundamental na manutenção da saúde do hospedeiro, a microbiota entérica tem sido utilizada e manipulada, através de bioterapias que equilibram as colónias bacterianas entéricas, de forma a promover um ambiente saudável. As bioterapias com probióticos e prebióticos têm o potencial de modificar o quadro sintomático e a progressão de patologias como a síndrome metabólica, a diabetes, a obesidade e as doenças neurodegenerativas (4, 5), sendo estas últimas o foco da atual monografia.

O hospedeiro, a microbiota entérica e seus metabolitos estabelecem uma comunicação através de vias bioquímicas e funcionais, afetando a homeostase e a saúde do primeiro. Assim, o TGI e sua respetiva microbiota entérica comunicam com o SNC através do eixo intestino-cérebro, havendo uma correlação entre a disbiose entérica e as doenças neurológicas (5, 6).

Probióticos- organismos vivos, nomeadamente bactérias, que quando ingeridos em quantidades adequadas beneficiam a saúde do hospedeiro (2).

Prebióticos- compostos por nutrientes não digeríveis tais como oligossacarídeos que estimulam seletivamente o crescimento e a atividade da

Existem três sistemas que participam nesta comunicação intestino-cérebro, nomeadamente, o sistema nervoso, o sistema neuroendócrino e por fim, o sistema imunológico. Estes três sistemas desenvolveram uma rede de comunicação molecular altamente integrada, tendo sido possível verificar que o desequilíbrio desta rede abre portas para o desenvolvimento de alterações no comportamento, na cognição, na memória, na resistência à insulina, no metabolismo lipídico, nos marcadores oxidativos e na ativação imunológica (5, 6).

Vários investigadores verificaram que os doentes de Alzheimer e de Parkinson apresentavam frequentemente disbiose entérica (7, 8). Paralelamente, observaram que a manipulação da microbiota entérica pode prevenir alguns efeitos agravantes da doença neurodegenerativa, como a redução dos níveis de neurotransmissores, a inflamação crónica e o stresse oxidativo. Foi identificada uma alta taxa de comorbilidades gastrointestinais nestes doentes o que leva a pressupor haver uma melhoria dos sintomas da doença neurodegenerativa aquando do restabelecimento da simbiose entérica. Apesar de todos os achados encontrados acerca deste eixo ser concordante com a presença de uma correlação entre a disbiose da microbiota

entérica e as alterações do SNC, ainda não foi encontrado o principal meio de atuação entre estes sistemas (5).

O principal objetivo da presente dissertação é compreender a influência da atividade da microbiota entérica sob o SNC e sua interação com o mesmo. De forma a atingir este objetivo foi analisada a literatura científica publicada neste âmbito e interpretados os resultados da influência da microbiota entérica nas alterações cognitivas e comportamentais e na sintomatologia das doenças de Parkinson e de Alzheimer. Por fim, este trabalho pretende compreender os mecanismos subjacentes à interação microbiota entérica-SNC.

## Metodologia

Para a elaboração desta dissertação foi realizada uma revisão da literatura científica referente ao tema, na base de dados do PubMed, entre os meses de Setembro a Dezembro de 2018. Para esta pesquisa foram usados como termos de pesquisa: “gut microbiota OR gut-brain axis AND neurodegenerative diseases”, “gut-brain axis AND mental health”, “gut-brain axis AND Parkinson” e “gut-brain axis AND Alzheimer”. Foram pesquisados artigos classificados como “clinical trials e “reviews”, escritos em inglês, espanhol ou português e publicados nos últimos 10 anos. Como resultado da pesquisa efetuada foram obtidos, no total 380 artigos científicos.

Primeiramente, foram excluídos artigos com base na leitura do título do artigo. Posteriormente, o método de exclusão baseou-se na análise dos *abstracts*. Por último, os artigos apresentados nesta monografia foram selecionados com base na sua leitura e análise. Adicionalmente, foram consultados artigos publicados em anos mais distantes por apresentarem relevância para a descrição da patogénese de doenças como a doença de Parkinson e de Alzheimer.

Após a análise ponderada do material considerado pertinente, realizou-se a presente revisão de literatura.



# 1. A microbiota entérica

A microbiota entérica é um ecossistema, que apesar de ser dominado por bactérias, principalmente bactérias anaeróbicas, também é formada por vírus, bacteriófagos, protozoários e fungos que habitam em simbiose no nosso intestino (9). A microbiota entérica pertence à microbiota comensal humana que está presente, na grande maioria, na pele e cavidades com comunicação para o exterior do organismo, como a vagina e o TGI (10).

A microbiota entérica é constituída, predominantemente, por dois Filos, o *Firmicutes* e *Bacteroides* (11). Conseqüentemente, ela é formada por microrganismos benéficos e microrganismos patogênicos que causam infecção (tabela 1) (12).

Tabela 1- Grupos de microrganismos presentes na microbiota entérica. (12)

Microrganismos benéficos	Microrganismos patogênicos
<i>Lactobacteria</i>	<i>Bacteriodes</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bacilli</i>
<i>Enterococci</i>	<i>Clostridia</i>
<i>Propionobacteria</i>	<i>Enterobacteria</i>
<i>Peptostreptococci</i>	<i>Actenobacteria</i>
	<i>Peptococci</i>
	<i>Staphylococci</i>
	<i>Streptococci</i>
	<i>Yeasts</i>

## 1.1. O desenvolvimento da microbiota entérica

O intestino do recém-nascido é considerado estéril até ao seu nascimento, apesar de recentes estudos apontarem para a existência de uma possível colonização intestinal ainda no útero materno (13). A colonização do intestino, na maior parte, inicia-se durante a passagem do bebê pelo canal de parto, onde este é exposto à microbiota da mãe (14).

Apesar de o tipo de parto ser um fator importante na origem da microbiota entérica, também a idade gestacional influencia a sua composição. Barrett *et al.* (2013) analisaram amostras fecais de 10 crianças pré-termo e verificaram que a microbiota destes não continha *Bifidobacterium* nem *Lactobacillus*, sendo estes os dois principais constituintes presentes no recém-nascido de termo (15).

Nos primeiros dias de vida a microbiota entérica do recém-nascido é pouco diversificada e bastante instável, tornando-se mais estável após a introdução do leite artificial ou materno. De salientar que a tipologia da alimentação influencia a composição da microbiota, sendo que a alimentação com leite materno torna a microbiota entérica menos diversificada mas mais estável, em comparação com a microbiota de recém-nascidos alimentado exclusivamente com leite artificial (16).

Do primeiro ao segundo ano de vida a microbiota entérica da criança sofre uma nova alteração devido à diversificação da alimentação com a introdução da comida sólida. Verificou-se que esta variação na alimentação tem um papel fulcral na formação da microbiota entérica a longo prazo. Pensa-se que seja entre os 18-36 meses de vida que a microbiota entérica sofre a sua última grande alteração, começando a assemelhar-se à microbiota entérica do adulto. Esta estabilidade da microbiota é alcançada mais rapidamente se a introdução da comida sólida ocorrer de forma precoce (17, 18).

Atingindo a idade adulta a microbiota entérica mantém-se estável ao longo do tempo e torna-se única e característica de cada indivíduo, contudo quando o hospedeiro é exposto a fatores externos como a utilização de antibióticos ou a alteração da dieta, a microbiota entérica pode sofrer alterações quantitativas de certas estirpes bacterianas, mas em situações normais esta consegue resistir e restaurar o seu núcleo microbiano estável (19, 20).

Com o envelhecimento do hospedeiro a diversidade e a estabilidade da microbiota entérica diminuem consoante o estado de saúde do mesmo (21).

Apesar da grande resiliência e plasticidade da microbiota entérica, esta pode sofrer um fenómeno de disbiose caracterizado pela alteração na quantidade e qualidade das colónias presentes na microbiota quando exposta a diversos fatores como o uso desmesurado de antibióticos, a dieta e os estilos de vida inapropriados, as infeções, a realização de cesarianas e o abandono da amamentação materna (10). A disbiose entérica correlaciona-se com a elevada prevalência de patologias crónicas, tais como doenças inflamatórias intestinais, doenças autoimunes, *Diabetes Mellitus*, neoplasias e doenças neurodegenerativas (22).

## **1.2. Funções da microbiota entérica**

O organismo mantém uma relação bidirecional e mutualista com a microbiota entérica. Assim o hospedeiro fornece nutrientes e proteção para estes microrganismos e a microbiota entérica fornece proteção contra agentes patogénicos, fornece nutrientes essenciais e vitaminas, promove a estimulação do sistema imunitário e auxilia na digestão de componentes da dieta. Portanto a microbiota fornece saúde para os hospedeiros e estes fornecem as condições necessárias para a sobrevivência da microbiota (10).

Verificou-se que a microbiota entérica e os seus metabolitos estão envolvidos na modulação das funções gastrointestinais, tais como, alteração da permeabilidade intestinal (23), da função imunológica (24), da motilidade (25) e sensibilidade intestinal (26) e por fim, alteração da atividade do sistema nervoso entérico (SNE) (27). Paralelamente, a microbiota entérica exerce também um papel essencial na comunicação entre o TGI e o SNC (28). Estas correlações serão abordadas mais detalhadamente no capítulo 3.



## 2. Como se estuda o papel da microbiota entérica na saúde humana?

### 2.1. Probióticos e prebióticos

O interesse pelo uso de probióticos e prebióticos tem crescido exponencialmente nos últimos anos, quer através da sua introdução na alimentação quer através da administração isolada destes. Vários trabalhos têm comprovado que o uso destas substâncias traz vantagens para a saúde humana, proporcionando uma atividade antipatogénica, antidiabética, antiobesidade, anti-inflamatória, anticancerígena, anti-alérgica, angiogénica e, ainda, melhoria da saúde urogenital e do sistema nervoso (3, 29).

Os probióticos são definidos como organismos vivos, nomeadamente bactérias, que quando ingeridos em quantidades adequadas beneficiam a saúde do hospedeiro (tabela 2) (2).

Ao serem administradas as unidades de colónias adequadas de bactérias, elas somam-se à microbiota entérica já existente e conferem benefícios para o hospedeiro, tais como: síntese de vitaminas do complexo B, vitamina K, enzimas digestivas, como a lactase, protease e peptidase, regulação da absorção de colesterol e triglicéridos, produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs) e de enzimas citocromo P450-like. *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Bifidobacterias* são exemplos de probióticos frequentemente utilizados. Os prebióticos são compostos por nutrientes não digeríveis tais como oligossacarídeos (frutoligosacarídeos e os galatoligosacarídeos) que estimulam seletivamente o crescimento e a atividade da microbiota do TGI. Estes prebióticos são habitualmente fermentados pelas bactérias benéficas *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no cólon (3, 30).

Portanto, para que um alimento seja considerado prebiótico ele deve cumprir certos pré-requisitos tais como: não ser digerido ou absorvido pelo TGI superior, ser seletivamente fermentado pelas bactérias benéficas da microbiota entérica e ainda ser capaz de induzir efeitos benéficos para a saúde. Alguns destes efeitos podem ser alcançados através da modulação da microbiota, aumentando as colónias das Bifidobactérias e Lactobacilos, que por sua vez produzem AGCCs, como o butirato, que irão reduzir o Ph entérico e diminuir as colónias patogénicas intestinais de *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Clostridium* spp. (31). Os AGCCs libertados, também, estimulam as células epiteliais do cólon a secretarem água e iões, que conseqüentemente vão aumentar o volume fecal e acelerar o trânsito intestinal. Estes efeitos reduzem a exposição das células do cólon a agentes oxidativos, reduzindo a incidência de síndromes inflamatórias intestinais (29); os AGCCs por terem um efeito antimicrobiano protegem o hospedeiro de infeções patogénicas (32).

Assim, os prebióticos são o substrato das reações de fermentação realizadas pelas bactérias comensais do cólon, originando compostos orgânicos como o lactato, acetato, propionato e butirato, que têm sido associados a benefícios no âmbito da saúde (33, 34).

Paralelamente, observou-se através de estudos em animais que a ingestão de prebióticos leva à redução dos marcadores inflamatórios (35). Os galatoligosacarídeos por apresentarem uma estrutura semelhante à das microvilosidades intestinais, irão competir com a adesina bacteriana e impedir a ligação das bactérias patogênicas ao epitélio do cólon, exercendo assim uma atividade antipatogênica (36).

Além dos efeitos benéficos anteriormente mencionados, os probióticos e prebióticos apresentam uma capacidade de imunomodulação, influenciando a microbiota intestinal e atenuando a atividade de bactérias patogênicas, tais como a *Klebsiella pneumonia* e a *Clostridia perfringens*. A eficácia destes componentes bióticos depende de vários fatores, nomeadamente, das características do hospedeiro e da microbiota entérica pré-existente, da diversidade e abundância da microbiota, a unidade de formação de colônias utilizada nos probióticos, a incorporação concomitante de prebióticos e a atividade dos bacteriófagos. Estes últimos, são vírus que infetam determinadas bactérias provocando a lise das mesmas e desta forma, constitui uma barreira de proteção contra bactérias patogênicas e controlam o número de bactérias colonizadoras do TGI (3).

Recentemente verificou-se que os prebióticos, tais como a inulina, galatoligosacarídeos e frutoligosacarídeos, ao estimularem a produção de AGCCs, alteram o metabolismo lipídico, apresentam a capacidade de reduzir a pressão arterial, os níveis de glicémia, colesterol e triglicéridos e os fosfolípidos no sangue, minimizando o risco de o hospedeiro desenvolver diabetes, obesidade e aterosclerose (36, 37).

## “O segundo cérebro”: da microbiota entérica à saúde cerebral

Tabela 2 - Tipologia, definição e benefícios dos bióticos utilizados em estudos de avaliação da função da microbiota entérica na saúde humana.

Tipo de biótico	Definição	Benefícios
Probiótico  (exemplos: <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacillus</i> e <i>Bifidobacterias</i> )	Organismos vivos, nomeadamente bactérias, que quando ingeridos em quantidades adequadas beneficiam a saúde do hospedeiro (2).	<ul style="list-style-type: none"><li>• Síntese de vitaminas do complexo B,</li><li>• Síntese de vitamina K,</li><li>• Síntese de enzimas digestivas, como a lactase, protease e peptidase,</li><li>• Regulação da absorção de colesterol e triglicerídeos,</li><li>• Produção de AGCCs e de enzimas citocromo P450-like (3).</li></ul>
Prebióticos  (exemplos: oligossacarídeos)	Nutrientes não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento e a atividade da microbiota do TGI (3).	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aumento das colónias de Bifidobacterias e Lactobacilos, que por sua vez produzem AGCCs (32),</li><li>• Ligação às células epiteliais do cólon competindo com a adesina bacteriana - atividade antipatogénica (36),</li><li>• Alteração do metabolismo lipídico do hospedeiro (37).</li></ul>

A administração de probióticos e prebióticos tem sido atualmente aplicada em humanos de forma a avaliar a função da microbiota entérica nas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (mais detalhes no capítulo 4.3.)(38).

## 2.2 Antibióticos

A administração de antibióticos é o meio mais comum de induzir artificialmente e de forma controlada uma disbiose entérica. Os atuais estudos utilizam, mais frequentemente, a administração dos antibióticos neomicina e bacitracina em animais, de forma a avaliarem o impacto das alterações da microbiota. Estes fármacos provocam uma diminuição das colónias *Bacteroides* e *Enterococcus* e eliminam os *Lactobacillus* intestinais dos modelos experimentais. Esta abordagem é frequentemente utilizada para avaliar a correlação entre a microbiota entérica e as alterações do comportamento (39).

## 2.3 Estudos de infeção

Este tipo de estudo permite avaliar o impacto das infeções causadas por agentes entéricos patogénicos específicos na saúde do hospedeiro (39).

Bercik *et al.* (2010) observaram, através da infeção de ratos com o parasita não invasivo *Trichuris muris*, que a infeção entérica induz uma elevação sistémica de citocinas, do fator de necrose tumoral alfa e do interferão gama e uma redução dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), no hipocampo. Este estudo mostrou também que uma infeção entérica desencadeia um quadro inflamatório entérico e sistémico e um comportamento de ansiedade no modelo animal. De forma esquemática, neste trabalho os ratos foram divididos em 3 subgrupos: no subgrupo 1 foi administrado um probiótico após infeção com o parasita supracitado, no subgrupo 2 houve administração de imunossuppressores após a infeção e no subgrupo 3 foi realizada uma vagotomia antes da infeção; tendo sido, posteriormente avaliados, nestes 3 subgrupos, os níveis de citocinas, de BDNF e o comportamento dos animais. A administração de probiótico com *Bifidobacterium longum* no subgrupo 1 permitiu a normalização do comportamento dos animais e dos níveis de BDNF, e a administração de imunossuppressores no subgrupo 2 permitiu a normalização do comportamento e dos níveis de citocinas, apesar de não ter ocorrido influência sobre a expressão de BDNF. No subgrupo 3 observou-se a presença de alterações do comportamento compatíveis com um estado de ansiedade, mesmo tendo os ratos sido submetidos a vagotomia (40). Posso concluir com este trabalho que a inflamação entérica desencadeia alterações no comportamento dos animais e que a normalização do comportamento ocorre através de mecanismos dependentes e independentes da inflamação. Adicionalmente é possível verificar que as alterações do comportamento são independentes da integridade do nervo vago.

Recorrendo a modelos animais Gareau *et al.* (2011) procuraram avaliar a influência da infeção entérica e a ausência de microbiota entérica na memória. Neste estudo avaliaram a memória em dois grupos de ratos: ratos infetados com *Citrobacter rodentium* (bactéria patogénica não

entero-invasiva) e ratos livres de germes (ver detalhadamente no capítulo 2.4.). Através da avaliação da exploração a novos objetos foi possível verificar que os ratos infetados apresentavam uma alteração da memória, tendo uma tendência para explorarem objetos já expostos anteriormente, como se fossem novos objetos e que esta disfunção da memória foi prevenida através da administração de probióticos. Não obstante, observou-se também no grupo de ratos livres de germes uma alteração da memória (41).

Em conjunto os dados existentes sugerem uma correlação entre a infecção entérica e as alterações comportamentais e de memória.

## 2.4 Modelo animal livre de germes, do inglês “Germ free”

Nos estudos da microbiota podem ser utilizados animais convencionais e animais gnotobióticos. Os animais gnotobióticos podem ser axênicos ou livres de germes, do inglês “Germ free”, animais com microbiota definida, animais sem um patógeno específico (do inglês “specific pathogen free”) ou animais sem anticorpos para um vírus específico (do inglês “vírus antibody free”) (1).

De forma genérica, os animais livres de germes são utilizados de forma a serem estudados os efeitos da inoculação de uma determinada microbiota no hospedeiro, através da transplantação fecal ou através da administração de probióticos. Não obstante, as recentes investigações relativas às interações microbiota-hospedeiro também utilizam este modelo animal de forma a avaliar as alterações da função do SNC num hospedeiro sem microbiota entérica (1).

Os animais de livres de germes podem ser gerados de duas formas: remoção das crias através de cesariana ou histerectomia da progenitora convencional e isolamento das mesmas num ambiente estéril, de forma a evitar a contaminação das crias com a microbiota da progenitora

**Gnotobiótico:** palavra de origem grega (gnoto=conhecer + biota=vida)(1).

**Animal convencional:** animal com microbiota indefinida, por não ocorrer manipulação da mesma a partir de medidas assépticas (1).

**Animal gnotobiótico:** animal manipulado de forma a apresentar uma microbiota bem conhecida ou ausente (1).

**Animal livre de germes ou “Germ free”:** animal gnotobiótico livre de bactérias, vírus, fungos, protozoários e de formas saprofíticas ou parasitárias (1).

ou transferência e implantação de embriões em fêmeas livres de germes, podendo estas dar à luz e alimentar as crias sem comprometer o estado “Germ free”. Os animais livres de germes são mantidos, por toda a sua vida, num ambiente estéril e são realizadas recorrentes análises microbiológicas às suas fezes de forma a comprovar a manutenção do estado “Germ free” (1). A partir destes animais livres de germes os investigadores podem avaliar os efeitos específicos da interação de uma microbiota definida com o hospedeiro. Assim podemos inocular microrganismos isoladamente ou transplantar uma microbiota humana no animal livre de germes, de forma a avaliar a interação microbiota entérica-hospedeiro (1).

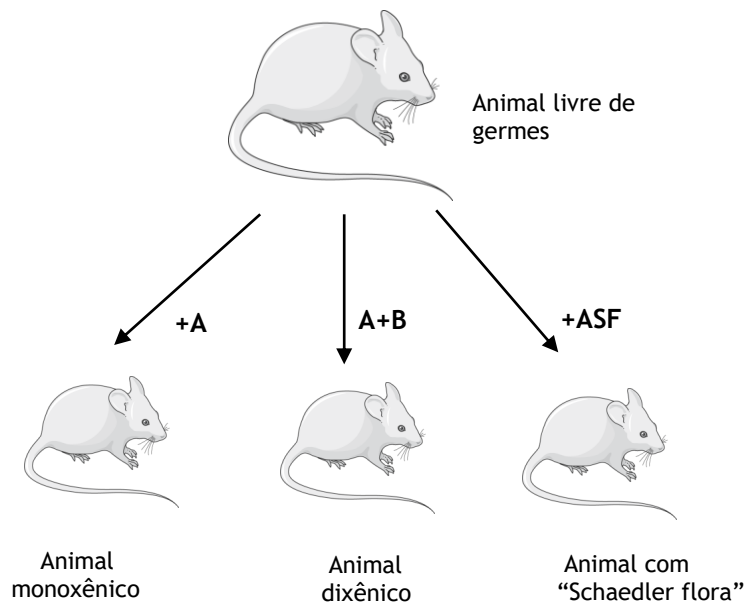


Figura 1- Modelo de manipulação da microbiota num animal gnotobiótico livre de germes: Inoculação de um único microrganismo (A) - animal monoxênico; inoculação de dois microrganismos (A+B) - animal dixênico; inoculação da microbiota definida “Schaedler flora”.

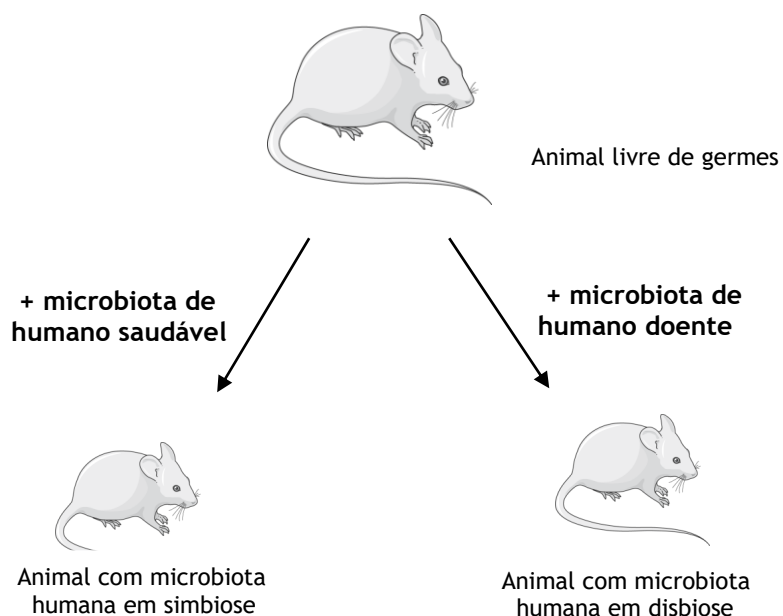


Figura 2 - Modelo de manipulação da microbiota num modelo não-gnotobiótico: Inoculação de microbiota humana em simbiose e em disbiose em animais livres de germes permitem criar uma condição “human-like”.

## 3. Eixo microbiota entérica-intestino-cérebro

O eixo intestino-cérebro representa uma comunicação bidirecional e interativa que estabelece sinais reguladores, pelas vias neuro-endócrino-imunológicas, entre o SNC e o TGI (42).

Existem 3 formas de comunicação dentro deste eixo: transmissão nervosa através dos ramos do nervo vago, transmissão endócrina através das hormonas e transmissão imunomediada através de citocinas, ou seja, pelo sistema imunológico (43, 44).

### 3.1 Mecanismos de ação

Existem, teoricamente, diferentes mecanismos de ação, através dos quais a microbiota entérica influencia a saúde cerebral. A grande maioria destes mecanismos requer que os microrganismos e seus metabolitos consigam aceder às camadas profundas do intestino de forma a permitirem a ativação de outros fatores que terão impacto a nível central. Desta forma, a permeabilidade intestinal é, provavelmente, o fator mais importante para dar início à interação microbiota entérica-intestino-cérebro (45).

De seguida serão apresentados diferentes mecanismos implicados na comunicação microbiota entérica-intestino-cérebro.

#### 3.1.1 Barreira intestinal e sua permeabilidade

O epitélio intestinal desempenha uma importante função na absorção de nutrientes e, pela presença das *junções oclusivas* das células epiteliais, este também desempenha funções de barreira física. A adequada permeabilidade intestinal é essencial para o correto funcionamento da barreira física do epitélio intestinal, desta forma, caso esta permeabilidade seja comprometida ocorre a passagem de microrganismos e dos seus metabolitos para a corrente sanguínea (45). A alteração da permeabilidade intestinal ocorre quando a microbiota entérica sofre uma alteração no seu equilíbrio, como por exemplo através do uso de antibióticos ou do aumento das colónias bacterianas intestinais patogénicas, que por produzirem toxinas e desencadearem uma resposta inflamatória provocam um aumento da permeabilidade intestinal (46).

Do lado oposto, diversos estudos verificaram que a barreira física intestinal pode ser reestabelecida e as *junções oclusivas* podem ser protegidas através da administração de probióticos. Tais factos foram observados em doentes com distúrbios gastrointestinais que realizaram tratamento com probióticos (47).

Com o aumento da permeabilidade intestinal os microrganismos e seus metabolitos passam mais facilmente para a corrente sanguínea e para o tecido linfóide mesentérico, desencadeando uma resposta imunitária com libertação de citocinas inflamatórias, ativação do nervo vago e de neurónios aferentes da medula espinhal, que por sua vez, irão modular o SNC e o SNE (48). Por outro lado, o aumento da permeabilidade permite a passagem de produtos do metabolismo de bactérias, como os lipopolissacarídeos (LPS) ou peptídeos neuroativos que irão também modular o SNC e SNE. Os LPS podem modular o SNC e SNE através da ativação dos recetores *toll-like* presentes nas células epiteliais, nos neurónios entéricos e sensoriais aferentes da medula espinhal e em diversas células cerebrais (45). Desta forma alterações da permeabilidade intestinal podem desencadear efeitos a nível central.

### 3.1.2 Metabolitos bacterianos e neurotransmissores

Os metabolitos bacterianos e os neurotransmissores podem ser absorvidos no TGI e entrar na corrente sanguínea, exercendo, posteriormente, efeitos em órgãos, como o cérebro. Podem também interagir diretamente com as células endócrinas e nervosas do intestino, que por sua vez irão comunicar com o SNC. Como já referido, os LPS libertados pelas bactérias influenciam diretamente a atividade neurológica ativando os recetores *toll-like* das células da microglia o que causa a libertação de citocinas inflamatórias no SNC, ou indiretamente ao induzirem a libertação destas mesmas citocinas no TGI (45).

Um outro exemplo de metabolitos bacterianos são os AGCCs que são libertados pela microbiota entérica do cólon, dando origem a acetato, propionato e butirato, que possuem propriedades neuroativas. MacFabe *et. al* (2011) verificaram, através de administração intracerebroventricular de ácido propionato em ratos jovens, que estes animais apresentavam alterações do comportamento semelhantes às que ocorrem no espectro de autismo, juntamente com uma resposta neuroinflamatória (49). Este achado permite-nos concluir que a presença de AGCCs a nível central é prejudicial, contrariamente ao efeito benéfico que estes proporcionam quando presentes no TGI, tal como já foi indicado.

A microbiota entérica é também capaz de produzir e libertar neurotransmissores e neuromoduladores (tabela 3), como produtos secundários do seu metabolismo, que podem induzir alterações no SNC e SNE, pela via aferente vagal e espinhal ou pela corrente

## “O segundo cérebro”: da microbiota entérica à saúde cerebral

sanguínea. São exemplos de neuromoduladores os AGCCs, metabolitos dos ácidos biliares, precursores e metabolitos do triptofano e citoquinas (50, 51).

São exemplos de neurotransmissores libertados pela microbiota entérica o ácido gama-aminobutírico (GABA), a noradrenalina, a serotonina, a dopamina e a acetilcolina. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, regulando processos fisiológicos e psicológicos, de tal forma que a desregulação deste neurotransmissor acarreta alterações como a ansiedade e a depressão (52). A serotonina é um metabolito do aminoácido triptofano, sendo um importante neurotransmissor a nível do SNC e do TGI. Esta tem a capacidade de regular o humor, o comportamento, o apetite, os ciclos circadianos, e os movimentos intestinais (53). A dopamina regula funções do SNC tais como o movimento, a cognição, as emoções e a secreção de hormonas (53). A noradrenalina é um neurotransmissor essencial para o sistema nervoso simpático, ativando as respostas de luta ou fuga, aumentando a frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo para o sistema músculo-esquelético (53). No SNC, a acetilcolina é essencial para o desempenho das funções cognitivas, como a aprendizagem e a memória (54).

Relativamente à libertação de neurotransmissores pelas colónias bacterianas, os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão associados à síntese e libertação de GABA, *Bacillus* produzem noradrenalina, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* spp. produzem triptofano e os *Bacillus* podem também produzir dopamina. Por último, a acetilcolina é produzida por *Lactobacillus* e *Bacillus*. Esta síntese microbiana de neurotransmissores pode modular eventos fisiológicos no cérebro, pois estes têm a capacidade de atravessar a mucosa intestinal e estimular a via de sinalização aferente do nervo vago (55, 56).

Tabela 3- Tipos de metabolitos libertados por determinados microrganismos e suas ações (tabela adaptada de Rashad Alkasir et al. (2017) (57)).

Microrganismo	Metabolito libertado	Ação
<i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i>	GABA	Regulação do estado de ansiedade e depressão.
<i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> e <i>Lactobacillus</i>	Triptofano (aminoácido essencial na síntese de serotonina, entra na circulação sanguínea a partir do TGI e atravessa a barreira hematoencefálica podendo dar início à síntese cerebral de serotonina).	Regulação das emoções.
<i>Bacillus</i>	Noradrenalina	Regulação das funções motoras, cognitivas, emocionais e da

		memória.
<i>Lactobacillus</i> e <i>Bacillus</i>	Acetilcolina	Regulação das funções cognitivas, em particular as funções de aprendizagem e de memória.
<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Enterococcus</i>	Histamina	Regulação do sono e das funções cognitivas.
<i>Clostridium</i> e <i>C. sporogenes</i>	Ácido propiónico	Função antioxidante e neuroprotetora.
<i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Roseburia</i> e <i>Provetella</i> ,	AGCCs	Fonte de energia para o hospedeiro, regula a função das células endoteliais, promove a síntese e secreção de neurotransmissores e hormonas e, ainda, regula a inflamação.
<i>Cyanobacteria</i>	Beta-N-metilamino-L-alanina	Desencadeia lesão neuronal.
<i>Escherichia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus</i>	Dopamina	Função ativa sobre a doença de Parkinson, Alzheimer e a depressão.
<i>L. fermentum</i> e <i>B. animalis</i>	Ácido ferúlico	Propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sua suplementação em ratos permitiu reduzir a formação de beta amiloide e do stresse oxidativo.

A influência da atuação dos metabolitos bacterianos e dos neurotransmissores na comunicação microbiota entérica-TGI-SNC será abordada mais pormenorizadamente secção 4.

### 3.1.3 Atuação do nervo vago

Pensa-se que seja o nervo vago um dos principais elementos da interação microbiota entérica-intestino-cérebro (45). Este inerva o pescoço, tórax e abdómen, orquestrando funções vitais do organismo. Participa na manutenção da homeostase através da regulação do ritmo cardíaco, da motilidade do TGI, da produção das secreções do TGI e do pâncreas, e da produção da glicose hepática. O nervo vago é, também, um importante componente no processo inflamatório, controlando as respostas imunitárias e a inflamação aquando da invasão por agentes patogénicos e da lesão tecidual (58).

Investigações realizadas em animais conseguiram verificar que existe uma comunicação entre a microbiota entérica e o SNC através do nervo vago. Observou-se, em animais com infeção

intestinal por *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* ou *Citrobacter rodentium*, uma transmissão da informação desde o intestino até ao cérebro a partir do nervo vago, que é comprovada pelo aumento da expressão de c-fos (usado como marcador da atividade neuronal) no cérebro aquando da infeção; paralelamente, nestes animais testados observaram-se alterações no comportamento compatíveis com um estado de ansiedade. Em animais vagotomizados não ocorreram alterações cerebrais em resultado da infeção, nem alterações do comportamento (59-61).

Por existir uma relação bidirecional entre a microbiota entérica/TGI e o SNC, tanto a microbiota influencia o SNC, como este pode alterar o funcionamento intestinal e ter algum impacto sobre a microbiota. Neste sentido é importante relembrar que quando ocorre lesão ou interrupção do nervo vago surgem alterações da motilidade intestinal, principalmente a diminuição do peristaltismo, que por sua vez estão associadas ao sobrecrecimento bacteriano intestinal, alterando a composição e estrutura da microbiota entérica (62, 63). A modulação da secreção do muco, também influenciada pela atividade vagal, tem um importante efeito sobre o tamanho e a qualidade da camada de muco intestinal, sendo esta um importante habitat para o biofilme da microbiota entérica (64).

A integridade do nervo vago é essencial para a homeostase do organismo ao mesmo tempo que participa na transmissão de informação para o SNC e também modula as condições de habitat e a composição da microbiota entérica.

### 3.1.4 Eixo hipotálamo-hipófise

O eixo hipotálamo-hipófise pode ser ativado em resposta a fatores como as emoções ou o stresse, sendo este considerado o eixo eferente que controla as respostas adaptativas do organismo a qualquer estímulo indutor de stresse (65).

A ativação deste eixo leva à secreção de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo que irá estimular a libertação da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) pela hipófise, que por sua vez, leva à libertação de cortisol pelas glândulas suprarrenais (Figura 3) (66).

O cortisol é a principal hormona responsável pela resposta ao stresse, modulando a função de diversos órgãos e sistemas, como o SNC e o sistema imunitário, este último, ativa a produção de citocinas que podem alterar a permeabilidade e a função de barreira do intestino, desencadeando uma modificação da microbiota entérica (39).

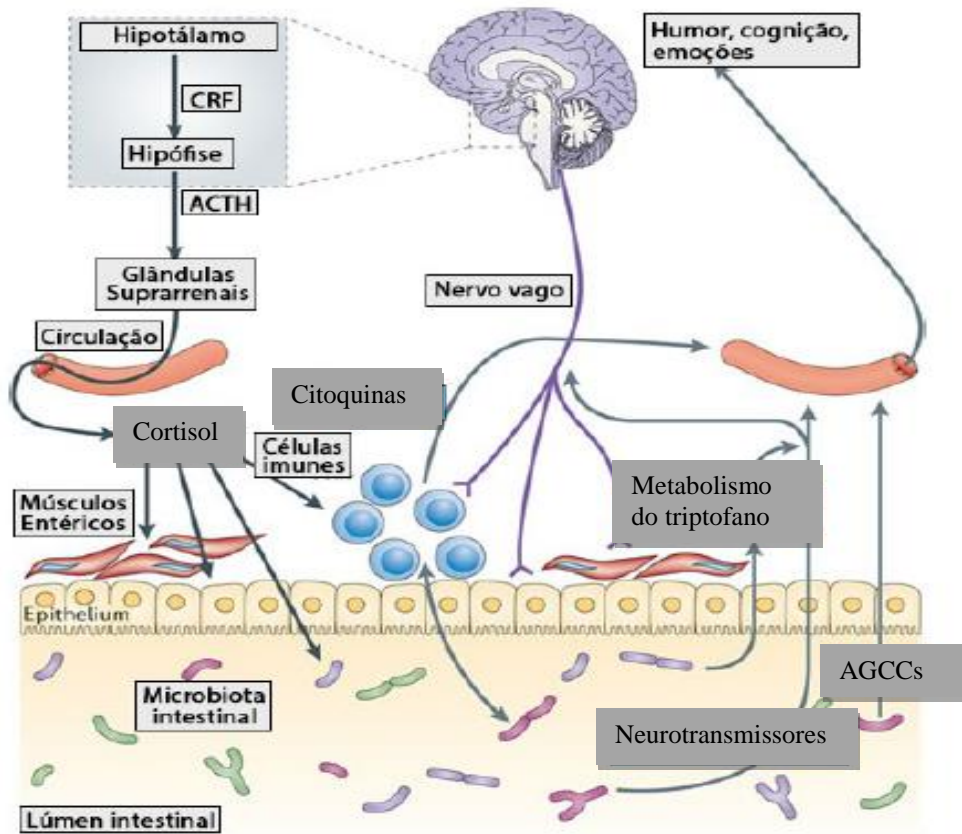


Figura 3 - Mecanismos envolvidos na comunicação bidirecional do eixo intestino-cérebro (adaptado de Cryan e Dinan, 2012).

## 4. A microbiota entérica e a doença neurológica

A microbiota entérica é imprescindível para a homeostase de um organismo e a disbiose está presente nas patologias gastrointestinais e sistêmicas e está associada a alterações do comportamento, da cognição e das emoções (67).

### 4.1. A microbiota entérica e as alterações comportamentais e cognitivas

Desbonnet *et al.* (2015), avaliou o impacto da alteração da microbiota entérica na adolescência e as suas implicações no comportamento na idade adulta. Estes autores administraram antibióticos em ratos com 21 dias levando à alteração da microbiota entérica com redução da abundância de Firmicutes e Bacteroidetes e elevação das colónias de Proteobacterias e Cyanobacterias. Foi possível verificar que nestes animais, que sofreram disbiose intestinal, os neuromoduladores, como o triptofano ou a quinurenina, essenciais na regulação do comportamento, sofreram uma depleção no SNC. Foi ainda possível concluir que os ratos que sofreram disbiose intestinal, na adolescência, apresentavam propensão para um comportamento ansioso, em adultos (55-80 dias) (68).

Sudo *et al.* (2004) compararam a resposta do eixo hipotálamo-hipófise a situações desencadeantes de stresse em ratos livres de germes e em ratos controlo, livres de patogénicos específicos, tendo verificado que os animais livres de germes possuíam níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona bastante mais elevados do que no grupo controlo, e apresentaram também uma redução da expressão do BDNF. Estes efeitos foram parcialmente revertidos após a transplantação fecal do grupo controlo nos ratos livres de germes e foram totalmente revertidos após administração conjunta de *Bifidobacterium infantis* (69).

Estes dados mostram que alterações da microbiota entérica provocam alterações a nível central, que se traduzem em alterações comportamentais e na resposta do eixo hipotálamo-hipófise.

Heijtz *et al.* (2011) e Neufeld *et al.* (2011) avaliaram de que forma a manipulação da microbiota entérica, em diferentes idades, desencadeia alterações a nível central. Curiosamente estes autores verificaram que ratos livres de germes tinham um comportamento menos ansioso em comparação com ratos livres de patogénicos específicos, aquando da realização de testes indutores de stresse. Heijtz e colegas testaram se a colonização dos ratos

livres de germes nos primeiros anos de vida poderia normalizar os seus comportamentos e se a descendência destes ratos teria o mesmo comportamento que os progenitores; assim um grupo destes animais foi colonizado com microbiota entérica dos ratos livres de patogénicos específicos antes do acasalamento. Após avaliação dos progenitores colonizados e da descendência foi possível verificar que os primeiros mantiveram o comportamento pouco ansioso, mas a descendência apresentou o mesmo comportamento que os ratos livres de patogénicos específicos. Com isto os autores procuraram perceber se a colonização dos ratos adultos livres de germes com a microbiota dos ratos livres de patogénicos específicos poderia normalizar o comportamento tal como aconteceu com a descendência, mas tal não aconteceu, o que nos leva a acreditar que existe um período decisivo no desenvolvimento da microbiota entérica e as alterações comportamentais do hospedeiro. Pelo facto de alterações comportamentais estarem relacionadas com alterações da neurotransmissão, estes autores avaliaram as alterações neuroquímicas, tendo verificado um aumento nos níveis de noradrenalina, dopamina e serotonina no corpo estriado dos ratos livres de germes, mas não no hipocampo nem no córtex (70-72).

Com estes estudos foi possível concluir que a ausência de microbiota entérica influencia o comportamento, sendo acompanhado por alterações na atividade neuroquímica cerebral, e que as vias neuronais podem ser moduladas no início do desenvolvimento do hospedeiro, existindo uma janela decisiva no período pós-natal que irá influenciar o traço comportamental do mesmo.

Ainda no campo das alterações comportamentais, Clarke *et al.* (2013) tentaram entender de que forma a microbiota entérica influencia o sistema serotoninérgico no hipocampo, sendo este importante no controlo do stresse e ansiedade. Estes autores verificaram que os ratos fêmeas e machos livres de germes apresentavam elevação dos níveis de corticosterona, após aplicação de um estímulo indutor de stresse, retratando um aumento da reatividade do eixo hipotálamo-hipófise. Contudo, só os ratos machos apresentavam este aumento, conjuntamente ao aumento da concentração de serotonina. As concentrações de triptofano foram superiores no grupo de ratos machos em comparação com o grupo de fêmeas e o grupo controlo. Posteriormente, foi avaliado se a colonização da microbiota entérica revertia os resultados, tendo-se concluído que a elevação da serotonina é resistente à colonização, mas esta restaura os níveis de triptofano. Heijtz e Neufeld, mostraram que os ratos livres de germes apresentavam redução dos comportamentos de ansiedade, mas esta alteração do comportamento é reversível com a colonização da microbiota nos primeiros momentos de vida. Pode-se, também, concluir com este trabalho que a ausência da microbiota entérica modula o sistema serotoninérgico e que existem diferenças entre os sexos; paralelamente, a alteração dos níveis de serotonina, ao contrário da alteração comportamental, é resistente à colonização da microbiota (73).

## “O segundo cérebro”: da microbiota entérica à saúde cerebral

De forma a avaliar as implicações da presença de infeção entérica nas alterações comportamentais, Lyte *et al.* (2006) infetaram ratos com *Citrobacter rodentium* e observaram o comportamento dos mesmos num teste de *hole-board*. Estes autores concluíram que os ratos infetados apresentavam sinais de ansiedade e que a transmissão de sinais entre o intestino e o cérebro foi realizado pela via vagal, demonstrada pela presença de mais neurónios positivos para a proteína c-fos ao nível do gânglio vagal dos ratos infetados (61).

Paralelamente aos estudos já retratados, vários investigadores procuraram avaliar a capacidade cognitiva, em especial a memória. Através da aplicação de testes de labirinto, Gareau *et al.* (2011) verificaram existir um défice de memória não-espacial e de memória de trabalho em ratos livres de germes, quando comparados com ratos livres de patógenos específicos. Esta alteração da memória foi acompanhada pela redução de BDNF e c-fos no hipocampo. Estes autores procuraram, ainda, avaliar o impacto da infeção entérica por *C. rodentium* na memória de um grupo diferente de ratos, tendo verificado não existirem alterações na memória destes, mas após exposição a um evento stressante estes ratos infetados apresentaram alterações da memória que não normalizaram após cura da infeção. Em conclusão, estes investigadores comprovaram existir uma correlação entre a ausência de microbiota entérica e o prejuízo na formação da memória, que a presença única de infeção não desencadeia alterações da memória, mas quando ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise por um estímulo de stress a memória sofre alterações (41).

De uma forma semelhante ao estudo anterior, Desbonnet *et al.* (2015) observaram que a depleção da microbiota entérica, provocada pela administração de antibióticos, desencadeou alterações cognitivas nos ratos testados e uma redução do BDNF no hipocampo (68).

Curiosamente, Matthews *et al.* (2013) verificaram que administrar oralmente uma bactéria comensal, *Mycobacterium vaccae*, em ratos promove uma melhoria da aprendizagem e da memória nestes animais. Estes resultados demonstram o impacto positivo que certos microrganismos têm sobre processos como a formação de memória (74).

Li *et al.* (2009) demonstraram que as alterações dietéticas provocam alterações na microbiota entérica, associadas a melhor desempenho cognitivo dos animais testados. Uma vez que a introdução de carne magra na dieta dos roedores aumenta o número e a diversidade de bactérias da microbiota entérica, os investigadores introduziram na ração de um grupo de ratos 50% de carne magra, tendo-se verificado que este grupo em comparação com o grupo de ratos com ração normal, apresentou melhorias da memória de trabalho e da memória de referência (75).

Davari *et al.* (2013) demonstraram que a administração de probióticos, durante 2 meses, com *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus fermentum* em ratos

diabéticos desencadeia eficazmente uma reversão da deterioração das funções cerebrais comum neste grupo de ratos, com melhoria da memória e da aprendizagem (76).

Bravo *et al.* (2011) demonstraram a ocorrência da redução dos comportamentos relacionados com a ansiedade e depressão em ratos tratados com probiótico *L. rhamnosus*, através do aumento de GABA no córtex pré-límbico e cingulado e da redução do GABA no hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e *locus coeruleus*. Além disto, observaram uma redução das capacidades cognitivas neste grupo por ocorrer um déficit na percepção do medo (77).

Infelizmente, existem escassas investigações sobre a interação microbiota entérica-cérebro, em humanos. Apesar disto, já foram aplicados alguns estudos com o objetivo de determinar os efeitos da modulação da microbiota entérica humana através da aplicação de probióticos, sobre as funções cerebrais. Um estudo randomizado em que foram administrados probióticos contendo *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum*, durante 30 dias, a um grupo de 10 adultos e que foram comparados com um grupo de 15 elementos que recebeu o placebo, demonstrou existir uma melhoria dos scores de ansiedade e depressão no grupo que utilizou os probióticos, traduzindo uma melhoria do stresse psicológico e da ansiedade (78).

Outro estudo demonstrou, através da ressonância magnética funcional, a ocorrência de uma redução da resposta da rede cerebral funcional viscerosensorial, somatosensorial e emocional e alterações na conectividade do mesencéfalo, em mulheres saudáveis com a ingestão crónica de probióticos (79). Utilizando o mesmo tipo de ressonância, observou-se que doentes com encefalopatia hepática, deterioração cognitiva moderada, e que tomaram concomitantemente a rifaximina (antibiótico não absorvível), sofreram uma modulação da microbiota entérica e um aumento da atividade subcortical, com melhoria da conectividade frontoparietal durante a realização de uma tarefa cognitiva (80).

## **4.2. A microbiota entérica e a doença de Parkinson**

Em 1817, James Parkinson descreveu pela primeira vez o quadro clínico da doença de Parkinson, caracterizado pela presença de sintomas motores, tais como o tremor em repouso, a lentificação dos movimentos, rigidez e instabilidade postural. A sua prevalência é superior em idades avançadas e desencadeia grandes limitações nas atividades da vida diária dos doentes. A doença de Parkinson é caracterizada pela acumulação e agregação da proteína alfa-sinucleína, com formação de corpos de Lewy no SNC, degeneração da via nigro-estriatal dopaminérgica que desencadeia um padrão anormal dos movimentos. O foco do tratamento desta patologia consiste na administração de levodopa, contudo muitos pacientes necessitam de terapias suplementares para controlar os sintomas típicos parkinsónicos e as alterações não-motoras, como, a alteração do olfato, obstipação, disfunção cardiovascular, urogenital e psiquiátrica (81).

## “O segundo cérebro”: da microbiota entérica à saúde cerebral

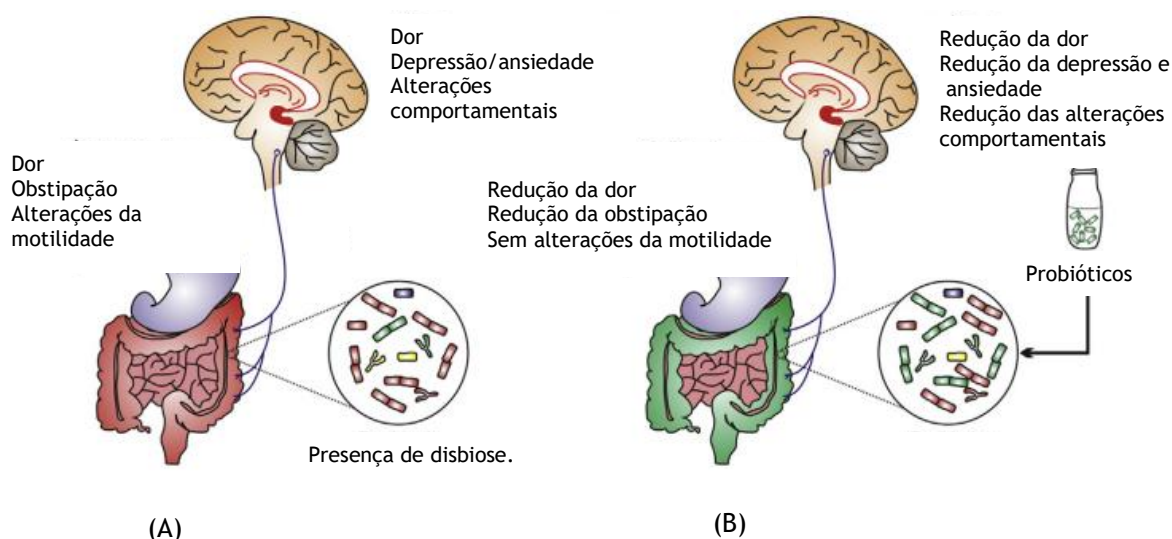


Figura 4- O eixo microbiota entérica-intestino-cérebro num doente parkinsoniano com e sem a administração de probióticos. (A) Correlação entre a disbiose entérica presente num doente parkinsoniano e a prevalência dos sintomas não motores da doença; (B) Melhoria dos sintomas não motores após terapêutica probiótica (82).

Certos estudos consideram que a microbiota entérica é responsável pela indução da produção da proteína alfa-sinucleína e que esta ascende pelo nervo vago sob forma de um príão (pequena molécula infecciosa formada por anormalidades proteicas). Esta proteína pode acumular em diversas regiões cerebrais, contudo a *substantia nigra* é especialmente sensível e vulnerável à acumulação de alfa-sinucleína. Verificou-se também a existência de acumulação da alfa-sinucleína nos neurónios do SNE do plexo mioentérico submucoso do TGI. Esta acumulação foi considerada responsável pelas alterações autonómicas do sistema gastrointestinal presentes nos doentes parkinsonianos (81, 83).

De forma a avaliar a participação do nervo vago na doença de Parkinson, Svensson e seus colegas (2015) exploraram o risco de desenvolver Parkinson em doentes submetidos a vagotomia total ou seletiva e verificaram que este risco é inferior nos pacientes submetidos a vagotomia total, em comparação com os doentes submetidos a vagotomia seletiva. Já estes últimos apresentam um risco de desenvolver Parkinson semelhante ao da população em geral. Estes achados sugerem, portanto, que o nervo vago está envolvido na patogénese da doença de Parkinson (77, 84). De salientar que, após a vagotomia a via eferente encontra-se, também, comprometida ocorrendo uma alteração da motilidade intestinal que desencadeia um sobrecrescimento bacteriano (85). Estes achados suportam a hipótese de que a doença de Parkinson se inicia no TGI e não no cérebro e que o nervo vago está fortemente implicado no desenvolvimento desta patologia (81).

Scheperjans e seus colegas (2015) avaliaram a microbiota entérica de 72 doentes com Parkinson e em comparação com o grupo controlo verificaram que a microbiota dos doentes parkinsonianos apresentava uma redução da concentração de *Prevotellaceae*, trazendo com isto uma redução da produção de mucina (uma proteína importante na barreira da mucosa contra agentes patogénicos) e que existe uma associação positiva entre o nível de

*Enterobacteriaceae* e a severidade da instabilidade postural e da marcha (8). Apesar de haver a necessidade de se fazer mais estudos, estes achados levam-nos a considerar que a constituição da microbiota entérica poderá ser preditora de prognóstico.

Num estudo similar, verificou-se, através de biópsias intestinais de doentes com Parkinson, existir na mucosa sigmóidea uma redução de bactérias produtoras do butirato com características anti-inflamatórias, tais como a *Roseburia* e *Faecalibacterium* spp. e uma elevação das colónias de *Proteobacteria* e de *Ralstonia*, com propriedades pró-inflamatórias. Neste grupo de doentes observou-se que a acumulação neuronal de alfa-sinucleína ocorre primariamente na mucosa sigmóidea, num período de 2-5 anos antes do desenvolvimento dos sintomas neurológicos da doença de Parkinson. Estes achados apoiam a hipótese da translocação via priónica da alfa-sinucleína, pelo nervo vago. Estas variações da microbiota entérica estão também associadas ao decréscimo na produção de AGCCs, que por sua vez induz alterações no SNE, contribuindo para a redução da motilidade gastrointestinal dos doentes com Parkinson (86-88).

Por fim, Mazmanian *et al.* (2016) comprovaram que os roedores geneticamente modificados para sobre-expressarem alfa-sinucleína desenvolviam as características da doença de Parkinson. Contudo, quando era removida a microbiota entérica destes animais, a tendência para desenvolver os sintomas motores reduzia significativamente. Contrariamente, a administração de AGCCs induz a ativação microglial e a agregação da alfa-sinucleína, desencadeando os sintomas motores. Estes sintomas eram inibidos através da administração do antibiótico de largo espectro minociclina. Observou-se também que nos animais com sobre-expressão de alfa-sinucleína e que posteriormente sofreram transplantação da microbiota humana de doentes com doença de Parkinson apresentaram sintomas Parkinsónicos, contrariamente aos animais onde foi transplantada a microbiota entérica de humanos saudáveis. Estes últimos achados apontam que o uso de antibióticos e a transplantação da microbiota entérica saudável exercem um potencial efeito favorável no tratamento da doença de Parkinson (89).

### **4.3. A microbiota entérica e a doença de Alzheimer**

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa progressiva e irreversível, sendo a causa mais frequente de demência. É uma doença bastante incapacitante que progride desde problemas minor de memória a perda completa das funções mentais, levando, numa fase terminal, à morte do doente. Os sintomas desta patologia são desencadeados pela perda progressiva da função colinérgica, pela morte dos neurónios do hipocampo e de outras regiões cerebrais que regulam e processam a memória. A doença caracteriza-se pela formação de placas de péptido beta-amiloide e de agregados intracelulares de proteína tau hiperfosforilada que levam à progressiva lesão neuronal (90).

Apesar de escassas, algumas investigações foram iniciadas de forma a avaliarem a influência da microbiota entérica no desenvolvimento e na progressão da doença de Alzheimer. Elmira Akbari *et al.* (2016) verificaram que após a suplementação de 200ml diários de leite enriquecido com *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus fermentum*, durante 12 semanas, num grupo de doentes com Alzheimer ocorria uma melhoria do score do Mini-Mental State Examination, da sensibilidade à insulina, do nível de triglicéridos, e ainda, redução dos níveis da proteína-C reativa e do malondialdeído (38).

Por ser sabido que existe uma correlação entre a inflamação crónica e o risco de desenvolver Alzheimer, vários investigadores apontam o estado inflamatório desencadeado pela disbiose entérica como o principal fator de correlação entre esta e a progressão da doença de Alzheimer. Wu *et al.* (2017) verificaram que a infeção por enterobactérias exacerba a progressão da doença de Alzheimer, através da elevação das citocinas inflamatórias (7) e Cattaneo *et al.* (2017) mostraram que os doentes com alterações cognitivas, com número elevado de colónias *Escherichia/Shigella* e reduzido número de colónias *E. rectale* apresentavam um estado inflamatório sistémico com elevação das citocinas inflamatórias, agravamento do défice cognitivo e aumento das placas de beta amiloide (91). Também, Chen *et al.* (2016) identificaram uma associação entre a disbiose existente na síndrome do cólon irritável e a elevação do risco de desenvolvimento de demência (92).

Curiosamente, Wang *et al.* (2015) demonstraram existir um efeito protetor dos polifenóis produzidos pela microbiota entérica em relação à progressão da doença de Alzheimer (93). Também, Yuan *et al.* (2016), comprovaram existir um efeito neuroprotetor das urolitinas produzidas pela microbiota entérica a partir dos polifenóis (94).

Em contrapartida, Hu *et al.* (2016) mostraram que as substâncias neuroativas metabolizadas e libertadas pela microbiota entérica são capazes de alterar a progressão da doença de Alzheimer. Bactérias entéricas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* produzem GABA, um neurotransmissor implicado na cognição. A metabolização do glutamato e a elevação de GABA no TGI está associada à elevação de GABA no SNC. Neste sentido, a disbiose entérica desencadeia redução do GABA no TGI e no SNC (95).

Apesar de existir um reduzido número de investigações neste âmbito e de ainda não se conhecer o mecanismo envolvido, os escassos estudos existentes apontam para a existência de uma correlação entre a disbiose entérica e a progressão da doença de Alzheimer.



## Conclusão

A microbiota entérica participa na homeostase do hospedeiro e por ser uma comunidade dinâmica esta sofre alterações na sua constituição ao longo da vida do mesmo, tornando-se característica de cada indivíduo. Apesar da resiliência da microbiota entérica esta pode sofrer um fenómeno de disbiose que está associado à elevada prevalência de patologias crónicas, como as doenças inflamatórias intestinais, doenças autoimunes, neoplasias e patologias neurodegenerativas.

Este sistema simbiótico tem sido associado a diferentes funções, nomeadamente na absorção de nutrientes, na proteção entérica contra agentes patogénicos, no desenvolvimento e estimulação do sistema imunitário, e na manutenção da saúde mental.

Várias evidências apontam para a presença de alterações comportamentais, da cognição e da memória em modelos animais sujeitos a manipulação da microbiota entérica. Nomeadamente, alguns estudos permitiram concluir que a disbiose entérica, provocada pela administração de antibióticos ou pela infeção entérica, propicia comportamentos de ansiedade nos modelos animais. Outros estudos verificaram que os animais livres de germes se apresentam menos ansiosos aquando da presença de um estímulo stressante, apesar de terem um elevado nível de corticosterona e de ACTH e défices na memória não-espacial e na memória de trabalho.

Estudos na área das doenças neurodegenerativas verificaram existir uma correlação entre a disbiose entérica e a progressão das mesmas. Relativamente à doença de Parkinson, alguns autores verificaram que o risco de desenvolver esta patologia é inferior nos pacientes submetidos a vagotomia total, sugerindo uma atuação do nervo vago na patogénese do Parkinson; outros comprovaram existir um agravamento dos sintomas motores com a disbiose entérica. Curiosamente, na doença de Alzheimer verificou-se existir uma melhoria da cognição através da administração de probióticos e concomitantemente correção da disbiose entérica.

Apesar de já existirem estudos em humanos, torna-se importante validar as conclusões observadas em estudos animais, em humanos e desta forma poder-se-ão desenvolver abordagens terapêuticas para a prevenção ou tratamento das alterações associadas à disbiose.

É essencial elucidar os mecanismos responsáveis pela comunicação entre a microbiota entérica e o SNC de forma a conseguirmos utilizar a modulação da microbiota entérica como tratamento ou fator prognóstico de doenças como o Parkinson e o Alzheimer.

No meu ponto de vista, esta temática é alargada e ainda pouco compreendida, e requer futuramente realização de mais estudos, principalmente em humanos.

## Bibliografia

1. Martin R, Bermudez-Humaran LG, Langella P. Gnotobiotic Rodents: An In Vivo Model for the Study of Microbe-Microbe Interactions. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:409.
2. Quigley EM. Probiotics in functional gastrointestinal disorders: what are the facts? *Current opinion in pharmacology*. 2008;8(6):704-8.
3. Vitetta L, Vitetta G, Hall S. Immunological Tolerance and Function: Associations Between Intestinal Bacteria, Probiotics, Prebiotics, and Phages. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2240.
4. George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*. 2018;26(3):927-39.
5. Westfall S, Lomis N, Kahouli I, Dia SY, Singh SP, Prakash S. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2017;74(20):3769-87.
6. Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, Mayer EA. The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 2018;6(2):133-48.
7. Wu SC, Cao ZS, Chang KM, Juang JL. Intestinal microbial dysbiosis aggravates the progression of Alzheimer's disease in *Drosophila*. *Nature communications*. 2017;8(1):24.
8. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2015;30(3):350-8.
9. Lankelma JM, Nieuwdorp M, de Vos WM, Wiersinga WJ. The gut microbiota in internal medicine: implications for health and disease. *The Netherlands journal of medicine*. 2015;73(2):61-8.
10. Alvarez-Calatayud G, Guarner F, Requena T, Marcos A. [Diet and microbiota. Impact on health]. *Nutricion hospitalaria*. 2018;35(Spec No6):11-5.
11. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8.
12. Subhash C. Mandal VMaTK. *Natural Products & Drug Discovery*. Amsterdam Elsevier; 2018.
13. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*. 2014;6(237):237ra65.
14. Donnet-Hughes A, Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, et al. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2010;69(3):407-15.

15. Barrett E, Kerr C, Murphy K, O'Sullivan O, Ryan CA, Dempsey EM, et al. The individual-specific and diverse nature of the preterm infant microbiota. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 2013;98(4):F334-40.
16. Fan W, Huo G, Li X, Yang L, Duan C. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in infants during the six months of life. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2014;24(2):133-43.
17. Bergstrom A, Skov TH, Bahl MI, Roager HM, Christensen LB, Ejlerskov KT, et al. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(9):2889-900.
18. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14691-6.
19. Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, Tims S, Zoetendal EG, de Vos WM. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental microbiology*. 2012.
20. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559-63.
21. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4586-91.
22. Stecher B, Maier L, Hardt WD. 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(4):277-84.
23. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2011;35(5 Suppl):14S-20S.
24. Camilleri M, Lasch K, Zhou W. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2012;303(7):G775-85.
25. Cani PD, Everard A, Duparc T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Current opinion in pharmacology*. 2013;13(6):935-40.
26. Valdez-Morales EE, Overington J, Guerrero-Alba R, Ochoa-Cortes F, Ibeakanma CO, Spreadbury I, et al. Sensitization of peripheral sensory nerves by mediators from colonic biopsies of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients: a role for PAR2. *The American journal of gastroenterology*. 2013;108(10):1634-43.

27. Forsythe P, Kunze WA. Voices from within: gut microbes and the CNS. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(1):55-69.
28. Clapp M, Aurora N, Herrera L, Bhatia M, Wilen E, Wakefield S. Gut microbiota's effect on mental health: The gut-brain axis. *Clinics and practice*. 2017;7(4):987.
29. Corzo N, Alonso JL, Azpiroz F, Calvo MA, Cirici M, Leis R, et al. [Prebiotics: concept, properties and beneficial effects]. *Nutricion hospitalaria*. 2015;31 Suppl 1:99-118.
30. Al-Khalaifah HS. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. *Poultry science*. 2018;97(11):3807-15.
31. Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of applied microbiology*. 2008;104(2):305-44.
32. Lamsal BP. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the science of food and agriculture*. 2012;92(10):2020-8.
33. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes*. 2017;8(2):172-84.
34. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2017;14(8):491-502.
35. Rastall RA. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual review of food science and technology*. 2010;1:305-39.
36. Sangwan V, Tomar SK, Singh RR, Singh AK, Ali B. Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *Journal of food science*. 2011;76(4):R103-11.
37. Manning TS, Gibson GR. Microbial-gut interactions in health and disease. *Prebiotics. Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2004;18(2):287-98.
38. Akbari E, Asemi Z, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, et al. Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial. *Frontiers in aging neuroscience*. 2016;8:256.
39. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews Neuroscience*. 2012;13(10):701-12.
40. Bercik P, Verdu EF, Foster JA, Macri J, Potter M, Huang X, et al. Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. *Gastroenterology*. 2010;139(6):2102-12 e1.
41. Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, Cho JH, Whary MT, Philpott DJ, et al. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut*. 2011;60(3):307-17.

42. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(3):926-38.
43. Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Begum-Haque S, Kasper LH. Gut, bugs, and brain: role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease. *Annals of neurology*. 2011;69(2):240-7.
44. Burokas A, Moloney RD, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota regulation of the Mammalian gut-brain axis. *Advances in applied microbiology*. 2015;91:1-62.
45. Yarandi SS, Peterson DA, Treisman GJ, Moran TH, Pasricha PJ. Modulatory Effects of Gut Microbiota on the Central Nervous System: How Gut Could Play a Role in Neuropsychiatric Health and Diseases. *Journal of neurogastroenterology and motility*. 2016;22(2):201-12.
46. Feltis BA, Kim AS, Kinneberg KM, Lyerly DL, Wilkins TD, Erlandsen SL, et al. Clostridium difficile toxins may augment bacterial penetration of intestinal epithelium. *Archives of surgery*. 1999;134(11):1235-41; discussion 41-2.
47. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2001;121(3):580-91.
48. Gareau MG, Silva MA, Perdue MH. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Current molecular medicine*. 2008;8(4):274-81.
49. MacFabe DF, Cain NE, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behavioural brain research*. 2011;217(1):47-54.
50. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(3):397-407.
51. Chey WY, Jin HO, Lee MH, Sun SW, Lee KY. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *The American journal of gastroenterology*. 2001;96(5):1499-506.
52. Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of applied microbiology*. 2012;113(2):411-7.
53. Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2011;33(8):574-81.
54. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(6):710-5.

55. Lyte M. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS pathogens*. 2013;9(11):e1003726.
56. Wall R, Cryan JF, Ross RP, Fitzgerald GF, Dinan TG, Stanton C. Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;817:221-39.
57. Alkasir R, Li J, Li X, Jin M, Zhu B. Human gut microbiota: the links with dementia development. *Protein & cell*. 2017;8(2):90-102.
58. Pavlov VA, Tracey KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8(12):743-54.
59. Goehler LE, Park SM, Opitz N, Lyte M, Gaykema RP. *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. *Brain, behavior, and immunity*. 2008;22(3):354-66.
60. Wang X, Wang BR, Zhang XJ, Xu Z, Ding YQ, Ju G. Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. *World journal of gastroenterology*. 2002;8(3):540-5.
61. Lyte M, Li W, Opitz N, Gaykema RP, Goehler LE. Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. *Physiology & behavior*. 2006;89(3):350-7.
62. Mayer EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut*. 2000;47(6):861-9.
63. Van Felius ID, Akkermans LM, Bosscha K, Verheem A, Harmsen W, Visser MR, et al. Interdigestive small bowel motility and duodenal bacterial overgrowth in experimental acute pancreatitis. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2003;15(3):267-76.
64. Macfarlane S, Dillon JF. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*. 2007;102(5):1187-96.
65. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*. 2002;53(4):865-71.
66. Burke HM, Davis MC, Otte C, Mohr DC. Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30(9):846-56.
67. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in physiology*. 2011;2:94.
68. Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, O'Sullivan O, Crispie F, Moloney RD, et al. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain, behavior, and immunity*. 2015;48:165-73.

69. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *The Journal of physiology*. 2004;558(Pt 1):263-75.
70. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(7):3047-52.
71. Neufeld KA, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Communicative & integrative biology*. 2011;4(4):492-4.
72. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2011;23(3):255-64, e119.
73. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular psychiatry*. 2013;18(6):666-73.
74. Matthews DM, Jenks SM. Ingestion of *Mycobacterium vaccae* decreases anxiety-related behavior and improves learning in mice. *Behavioural processes*. 2013;96:27-35.
75. Li W, Dowd SE, Scurlock B, Acosta-Martinez V, Lyte M. Memory and learning behavior in mice is temporally associated with diet-induced alterations in gut bacteria. *Physiology & behavior*. 2009;96(4-5):557-67.
76. Davari S, Talaei SA, Alaei H, Salami M. Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis. *Neuroscience*. 2013;240:287-96.
77. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(38):16050-5.
78. Messaoudi M, Violle N, Bisson JF, Desor D, Javelot H, Rougeot C. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut microbes*. 2011;2(4):256-61.
79. Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, Jiang Z, Stains J, Ebrat B, et al. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1394-401, 401 e1-4.
80. Ahluwalia V, Wade JB, Heuman DM, Hammeke TA, Sanyal AJ, Sterling RK, et al. Enhancement of functional connectivity, working memory and inhibitory control on multi-modal brain MR imaging with Rifaximin in Cirrhosis: implications for the gut-liver-brain axis. *Metabolic brain disease*. 2014;29(4):1017-25.
81. Dinan TG, Cryan JF. Gut Feelings on Parkinson's and Depression. *Cerebrum : the Dana forum on brain science*. 2017;2017.

82. Felice VD, Quigley EM, Sullivan AM, O'Keefe GW, O'Mahony SM. Microbiota-gut-brain signalling in Parkinson's disease: Implications for non-motor symptoms. *Parkinsonism & related disorders*. 2016;27:1-8.
83. Miraglia F, Betti L, Palego L, Giannaccini G. Parkinson's disease and alpha-synucleinopathies: from arising pathways to therapeutic challenge. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*. 2015;15(2):109-16.
84. Svensson E, Horvath-Puho E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 2015;78(4):522-9.
85. Grace E, Shaw C, Whelan K, Andreyev HJ. Review article: small intestinal bacterial overgrowth--prevalence, clinical features, current and developing diagnostic tests, and treatment. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2013;38(7):674-88.
86. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2015;30(10):1351-60.
87. Shannon KM, Keshavarzian A, Dodiya HB, Jakate S, Kordower JH. Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2012;27(6):716-9.
88. Unger MM, Spiegel J, Dillmann KU, Grundmann D, Philippeit H, Burmann J, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism & related disorders*. 2016;32:66-72.
89. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 2016;167(6):1469-80 e12.
90. Irizarry MC, Hyman BT. Alzheimer disease therapeutics. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2001;60(10):923-8.
91. Cattaneo A, Cattane N, Galluzzi S, Provasi S, Lopizzo N, Festari C, et al. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiology of aging*. 2017;49:60-8.
92. Chen CH, Lin CL, Kao CH. Irritable Bowel Syndrome Is Associated with an Increased Risk of Dementia: A Nationwide Population-Based Study. *PloS one*. 2016;11(1):e0144589.
93. Wang D, Ho L, Faith J, Ono K, Janle EM, Lachcik PJ, et al. Role of intestinal microbiota in the generation of polyphenol-derived phenolic acid mediated attenuation of Alzheimer's disease beta-amyloid oligomerization. *Molecular nutrition & food research*. 2015;59(6):1025-40.
94. Yuan T, Ma H, Liu W, Niesen DB, Shah N, Crews R, et al. Pomegranate's Neuroprotective Effects against Alzheimer's Disease Are Mediated by Urolithins, Its Ellagitannin-Gut Microbial Derived Metabolites. *ACS chemical neuroscience*. 2016;7(1):26-33.

95. Hu X, Wang T, Jin F. Alzheimer's disease and gut microbiota. *Science China Life sciences*. 2016;59(10):1006-23.

## Anexos

### Anexo I - Tabela resumo dos resultados obtidos na avaliação das implicações da microbiota entérica nas alterações comportamentais e cognitivas de animais de laboratório.

Autores	Metodologia	Resultados
Desbonnet <i>et al.</i> (2015)	Avaliação do comportamento em ratos sob antibioterapia.	Na idade adulta, os ratos que receberam antibiótico durante a adolescência apresentaram propensão para o comportamento ansioso (68).
Sudo <i>et al.</i> (2004)	Avaliação e comparação dos níveis de ACTH e corticosterona em dois grupos de ratos: ratos livres de germes e ratos livres de patogénios específicos.	Os animais livres de germes apresentaram níveis mais elevados de ACTH e corticosterona, tal como apresentaram redução dos níveis de BDNF. Estes achados foram revertidos após transplantação da microbiota entérica dos animais livres de patogénios específicos nos ratos livres de germes (69).
Heijtz <i>et al.</i> (2011) e Neufeld <i>et al.</i> (2011)	Avaliação e comparação do comportamento dos ratos livres de germes e dos ratos livres de patogénios específicos aquando da realização de testes provocadores de stresse.	Os ratos livres de germes apresentaram um comportamento menos ansioso do que o grupo controlo (70-72).
Clarke <i>et al.</i> (2013)	Avaliação dos níveis de corticosterona, serotonina e triptofano em ratos fêmeas e machos livres de germes aquando da realização de testes provocadores de stresse.	Tanto os ratos fêmeas e machos apresentaram elevação da corticosterona. Mas os ratos machos apresentaram, conjuntamente, uma elevação dos níveis de serotonina e triptofano. Após colonização da microbiota os níveis de triptofano normalizaram, mas o mesmo não ocorreu com os

		níveis de serotonina (73).
Lyte <i>et al.</i> (2006)	Observação do comportamento de ratos infectados com <i>Citrobacter rodentium</i> , num teste de <i>hole-board</i> .	Os ratos infectados apresentaram um comportamento ansioso aquando da realização do teste (61).
Gareau <i>et al.</i> (2011)	Avaliação e comparação da memória dos ratos livres de germes e ratos livres de patógenos específicos, através da aplicação de testes de labirinto.	Os ratos livres de germes apresentaram défice na memória não-espacial e na memória de trabalho (41).

## Anexo II - Tabela resumo dos resultados obtidos na avaliação das implicações da microbiota entérica na doença de Parkinson.

Autores	Metodologia	Resultados
Svensson <i>et al.</i> (2015)	Exploraram o risco de desenvolver Parkinson em doentes submetidos a vagotomia total ou seletiva.	Verificaram que o risco de desenvolver Parkinson é inferior nos pacientes submetidos a vagotomia total, em comparação com os doentes submetidos a vagotomia seletiva. Já estes últimos apresentam um risco de desenvolver Parkinson semelhante ao da população em geral. Estes achados sugerem que o nervo vago está envolvido na patogénese da doença de Parkinson e que os sinais aferentes deste nervo são mediados pela microbiota entérica (77, 84).
Scheperjans <i>et al.</i> (2015)	Avaliaram a microbiota entérica de 72 doentes com Parkinson e compararam a sua composição com o grupo controlo	Verificaram que a microbiota dos doentes parkinsonianos apresentava uma redução da concentração de <i>Prevotellaceae</i> , trazendo com isto uma redução da produção de mucina e que existe uma associação positiva entre o nível de <i>Enterobacteriaceae</i> e a severidade da instabilidade postural e da marcha (8).
Mazmanian <i>et al.</i> (2016)	Avaliaram o desenvolvimento dos sintomas parkinsonianos em	Comprovaram que este grupo de roedores desenvolviam as características

	<p>roedores geneticamente modificados para sobre-expressarem alfa-sinucleína.</p>	<p>da doença de Parkinson. Contudo, a tendência para desenvolver os sintomas motores reduzia significativamente após eliminação da microbiota entérica.</p> <p>Após administração de AGCCs os sintomas motores surgiam, juntamente com o aumento da agregação de alfa-sinucleína. Estes sintomas eram inibidos através da administração do antibiótico de largo espectro.</p> <p>Os animais com sobre-expressão de alfa-sinucleína e que posteriormente sofreram transplantação da microbiota humana de doentes com doença de Parkinson apresentavam a expressão da patologia, contrariamente aos animais onde foi transplantada a microbiota entérica de humanos saudáveis (89).</p>
--	---	---

### Anexo III - Tabela resumo dos resultados obtidos na avaliação das implicações da microbiota entérica na doença de Alzheimer.

Autores	Metodologia	Resultados
Elmira Akbari <i>et al.</i> (2016)	Suplementação de 200ml diários de leite enriquecido com <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , durante 12 semanas, num grupo de doentes com Alzheimer.	Melhoria do score do Mini-Mental State Examination, da sensibilidade à insulina, do nível de triglicéridos, e ainda, redução dos níveis da proteína-C reativa e do malondialdeído (38).
Wu <i>et al.</i> (2017)		Verificaram que a infeção por enterobactérias exacerba a progressão da doença de Alzheimer, através da elevação das citocinas inflamatórias (7).

Cattaneo *et al.* (2017)

Verificaram que os doentes com alterações cognitivas e concomitantemente com elevadas colónias de *Escherichia/Shighella* e reduzidas colónias de *E. rectale* apresentavam elevação das citocinas inflamatórias, agravamento do défice cognitivo e elevação do depósito cerebral de amiloide (91).