

Cátia Rafaela Ferreira Almeida

A influência do microbioma humano nas doenças cardiovasculares

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Cátia Rafaela Ferreira Almeida

A influência do microbioma humano nas doenças cardiovasculares

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

A influência do microbioma humano nas doenças cardiovasculares

Cátia Rafaela Ferreira Almeida

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Doutora Maria João Coelho

Sumário

Há quase um século é reconhecido que os seres humanos possuem um variado e denso ecossistema microbiano a que se dá o nome de microbioma humano, no entanto estamos ainda a começar de entender muitos dos papéis que estes microrganismos desempenham na saúde e no desenvolvimento humano.

Os microrganismos presentes no microbioma humano coexistem em harmonia com o seu hospedeiro, mas podem, em determinadas circunstâncias, causar doença. Estes fazem parte de um grupo de espécies que são encontradas em diversas áreas do corpo humano de indivíduos saudáveis normais, daí o microbioma também ser referido como a flora normal ou comensal. O microbioma é muito diverso e a sua composição varia consoante o local do corpo, sendo constituído principalmente por bactérias que desempenham um papel importante na manutenção de uma vida saudável e equilibrada.

Há uma crescente explicação de que mudanças na composição do microbioma podem promover uma suscetibilidade a longo prazo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, pois os metabolitos derivados da fermentação dos microrganismos presentes no microbioma são biologicamente ativos, em especial o N-óxido de trimetilamina (TMAO) que é reconhecido como um agente aterogénico.

Assim, a sua associação às doenças cardiovasculares permitirá compreender melhor a sua patogénese e também explorar novas abordagens terapêuticas, tornando o microbioma um alvo terapêutico, cada vez mais relevante.

Palavras-chave: Microbioma humano, doenças cardiovasculares, N-óxido de trimetilamina, aterosclerose, hipertensão, probióticos e prebióticos

Abstract

For almost a century it has been recognized that humans possess a varied and dense microbial ecosystem called the human microbiome, yet we are still beginning to understand many of the roles that these microorganisms play in human health and development.

The microorganisms present in the human microbiome coexist in harmony with their host but may under certain circumstances cause disease. Those are part of a group of species that are found in several areas of the human body, in normal healthy individuals, hence the microbiome is also referred to as the normal or commensal flora. The microbiome is very diverse and its composition varies according to the body site, being constituted mainly by bacteria that play an important role in maintaining a healthy and balanced life.

There is an increasing explanation that changes in the microbiome composition may promote long-term susceptibility for cardiovascular, because the metabolites from the fermentation of microorganisms present in the microbiome are biologically active, especially the trimethylamine N-oxide (TMAO), which is recognized as an atherogenic agent.

Therefore, its association with cardiovascular diseases will allow a better understanding of its pathogenesis and also explore new therapeutic approaches, making the microbiome a therapeutic target, increasingly relevant.

Key words: Human microbiome, cardiovascular diseases, trimethylamine N-oxide, atherosclerosis, hypertension, probiotics and prebiotics.

Agradecimentos

Com a finalização do meu percurso acadêmico, não poso deixar de agradecer a todas as pessoas que dele fizeram parte.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria João Coelho, por toda a paciência e ajuda prestada na elaboração desta monografia, especialmente pela forma como me acompanhou e orientou em todo o processo. Foi indispensável a sua ajuda para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos pela coragem e valores transmitidos, e principalmente por me ensinarem a trabalhar e a lutar pelos meus sonhos, sempre com uma palavra de incentivo e apoio.

Por fim, e de uma forma especial, gostaria também de agradecer a toda a minha família, em especial aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado pelo apoio e confiança incondicionais, nos bons e nos maus momentos, acreditando sempre que seria capaz de atingir todas as minhas metas traçadas, sem nunca fraquejar perante qualquer adversidade.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Índice

Sumário.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas.....	vii
Abreviaturas.....	viii
1. Introdução.....	1
2. Microbioma Humano.....	3
2.1. Tipos de microbioma.....	21
2.1.1. Cavidade Oral.....	21
2.1.2. Nasofaringe.....	7
2.1.3. Pele.....	8
2.1.4. Trato Gastrointestinal.....	13
2.1.5. Trato Urogenital.....	17
2.2. Evolução do microbioma ao longo da vida.....	219
2.3. Fatores que influenciam o microbioma.....	21
3. Doenças Cardiovasculares.....	25
3.1. Hipertensão.....	30
3.2. Aterosclerose.....	31

3.3.	Relação da periodontite com a aterosclerose.....	34
4.	Terapias Medicamentosas e Não Medicamentosas	37
4.1.	Probióticos.....	37
4.2.	Prebióticos	39
4.3.	Intervenção na dieta.....	41
4.4.	Transplante Bacteriano Fecal	42
5.	Perspetivas Futuras	44
6.	Conclusão	46
7.	Referências	48

Índice de Figuras

Figura 1 - Mapa representativo da caracterização do microbioma nas várias zonas do corpo humano

Figura 2 – Distribuição topográfica do microbioma cutâneo e a sua associação aos microambientes

Figura 3 – Composição e concentração do microbioma, de algumas regiões do trato gastrointestinal

Figura 4 – Influência da dieta no microbioma intestinal e na saúde humana

Figura 5 – Fatores de risco associadas às doenças cardiovasculares

Figura 6 – Diagrama simplificado da formação e metabolismo do N-óxido de trimetilamina

Figura 7 – Relação entre a alimentação, o microbioma humano e as doenças cardiovasculares

Figura 8 – Visão geral da ligação entre a disbiose, fatores de risco e as doenças cardiovasculares

Figura 9 – Efeito sinérgico dos microrganismos na disbiose da periodontite

Figura 10 – Mecanismos biologicamente plausíveis que relacionam a periodontite com certas doenças

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Ação de alguns microrganismos da pele e suas interações

Tabela 2 – Exemplos de potenciais tratamentos para as doenças cardiovasculares

Abreviaturas

TMAO – N-óxido de trimetilamina

HMP – Projeto Microbioma Humano

DCV – Doenças Cardiovasculares

FMO – Enzimas hepáticas Flavinas Mono-Oxidases

SCFA – Ácidos Gordos de Cadeia Curta

HA – Hipertensão Arterial

ECA – Enzima Conversora da Angiotensina

AVC – Acidente Vascular Cerebral

LPS – Lipopolissacarídeos

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade

DMT2 – Diabetes *mellitus* tipo 2

1. Introdução

O corpo humano é colonizado por trilhões de microrganismos que incluem espécies distintas de bactérias, fungos, vírus e protozoários. Juntos, esses microrganismos e os seus genes, constituem uma comunidade microbiana dinâmica que habita diferentes áreas do organismo e desempenham um papel vital na saúde, doença, crescimento e desenvolvimento do seu hospedeiro. A isto é chamado microbioma humano.

À semelhança do genoma humano, o microbioma é o património genético dos microrganismos que vivem com o ser humano, sendo classificado como a comunidade os seres microscópicos que colonizam diversas áreas do corpo humano, sendo elas superficiais ou profundas, como o aparelho genitourinário, o aparelho respiratório, o aparelho gastrointestinal, entre outros. O seu desenvolvimento é um processo dinâmico, variando ao longo da vida, e coexistindo com o seu hospedeiro, sendo parte ativa de muitos processos biológicos no organismo humano. Este envolvimento do microbioma em diversas funções torna-o essencial na manutenção do equilíbrio homeostático, e o seu comprometimento pode trazer problemas ao hospedeiro, como o aparecimento de diversas doenças, entre as quais as doenças cardiovasculares. (Khanna and Tosh, 2014)

Contrariamente ao genoma humano que raramente é influenciado por fatores externos, o microbioma humano caracteriza-se por ter alguma volatilidade, o que fica demonstrado com o uso de antibióticos, alterações na dieta ou estados de infeção no organismo hospedeiro, que posteriormente podem levar a grandes alterações nos microrganismos presentes no hospedeiro. No entanto, há fatores que modelam o microbioma, impedindo o desenvolvimento e prevalência de diversas doenças, levando a uma vida mais saudável, e das quais se destacam a dieta mediterrânica, terapias medicamentosas, o uso de probióticos e prebióticos e ainda o transplante bacteriano fecal. (Honda and Littman, 2016)

O local do organismo humano que alberga o maior número e diversidade de microrganismos é o trato gastrointestinal, mais precisamente o intestino, exercendo uma maior influência sobre os mecanismos homeostáticos humanos. Nesta dissertação, é dada especial atenção ao microbioma intestinal humano, uma vez que pensa-se ser o que tem

mais impacto na saúde humana e o que é mais facilmente modelado, especialmente no que respeita às doenças cardiovasculares. (Chong-Nguyen *et al.*, 2017)

Várias doenças cardiovasculares, bem como os seus fatores de risco, têm sido identificadas como exemplos da interação entre o hospedeiro e o microbioma gastrointestinal. (Griffiths *et al.*, 2016; Griffin *et al.*, 2015)

Assim, esta dissertação tem como objetivo fornecer uma versão geral e atualizada da relação intrigante entre o microbioma humano e as doenças cardiovasculares, procurando estabelecer a sua importância na saúde e na doença.

Para tal foi realizada uma pesquisa bibliográfica em bases de dados reconhecidas utilizando as palavras-chave microbioma humano, doenças cardiovasculares, N-óxido de trimetilamina, aterosclerose, hipertensão, probióticos, prebióticos, selecionando-se os artigos científicos considerados mais relevantes para a realização deste trabalho.

2. Microbioma Humano

O corpo humano de um adulto normalmente compreende dez vezes mais células microbianas do que células humanas, em grande parte devido à elevada diversidade de microrganismos existentes no trato gastrointestinal. Os microrganismos que constituem o microbioma humano podem co-existir em relações de comensalismo, quando a associação entre o microrganismo e o hospedeiro é aparentemente neutra, sem benefícios nem prejuízos identificáveis, ou em relações de mutualismo, quando a interação entre ambos é benéfica, não sendo condição obrigatória para a sobrevivência de ambos viverem juntos.

O desenvolvimento do microbioma humano é um processo dinâmico que comporta diferentes etapas e que demonstra diferenças notáveis em termos de diversidade e variedade, sendo que esta distribuição microbiana pelos vários locais do corpo humano, seja na cavidade oral, pele, trato gastrointestinal ou trato genitourinário, tem impacto na saúde do ser humano. A grande diversidade e variedade a nível do microbioma humano pode ser comprovada entre dois indivíduos diferentes ou mesmo num só indivíduo, isto porque devido ao seu dinamismo, o microbioma é diferente de pessoa para pessoa, e até mesmo nos diferentes locais anatómicos de um mesmo indivíduo, dado que cada parte do corpo é caracterizada por uma comunidade ecológica única de microrganismos, tornando assim cada microbioma único. Estas diferenças interpessoais estão relacionadas com o historial genético, origem geográfica, idade, estilos de vida, dieta e exposição prematura a microrganismos, bem como à regularidade do uso de antibióticos ou probióticos. (Ursell *et al.*, 2012b)

O microbioma humano fornece um ecossistema interno fundamental para numerosos processos fisiológicos, dentro dos quais se podem destacar alguns como a proteção contra agentes patogénicos, processamento de nutrientes, estimulação de angiogénese, desenvolvimento e manutenção da barreira epitelial intestinal, manutenção do sistema imunitário, entre outras, evoluindo assim conjuntamente com o hospedeiro para formar um superorganismo. (Honda and Littman, 2016)

Assim, a caracterização e compreensão da sua complexidade poderá constituir uma ferramenta de diagnóstico, criando oportunidades de melhoria de qualidade de vida através da manipulação do microbioma.

Foi nesta linha de pensamento que foi criado o Projeto Microbioma Humano (HMP), um programa internacional, com o intuito de gerar bases de pesquisa que permitam a caracterização abrangente do microbioma e a análise do seu papel na saúde e na doença, conhecendo assim todos os microrganismos existentes no nosso organismo, e a partir deste adquirir conhecimentos sobre a sua composição quando este habita organismos saudáveis e de que forma ele se encontra alterado em situações patológicas, podendo atuar na prevenção e tratamento de doenças. (Morgan *et al.*, 2013)

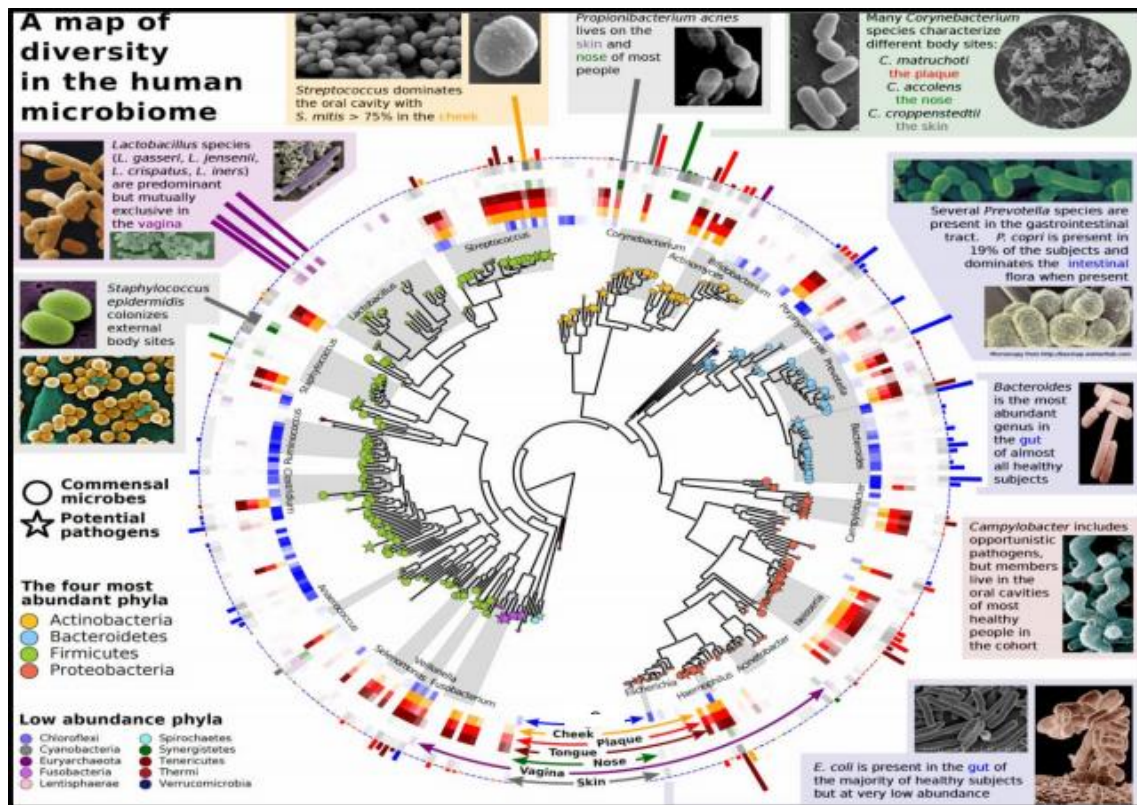


Figura 1 – Mapa representativo da caracterização do microbioma nas várias zonas do corpo humano (Morgan *et al.*, 2013)

Na figura 1 podemos observar um mapa que representa a grande diversidade no microbioma humano. Este é dominado por quatro filos: Actinobacteria (géneros

Bifidobacterium e *Corynebacterium*), Bacteroidetes (género *Bacteroides*), Firmicutes (que inclui géneros com *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*) e Proteobacteria (com géneros como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Campylobacter* e *Helicobacter*), sendo que cada um apresenta uma cor diferente para melhor se poderem distinguir. No centro encontra-se uma árvore filogenética dos microrganismos mais abundantes no microbioma humano, onde podemos distinguir os comensais dos patogénicos através da simbologia de círculos e estrelas, respectivamente. Por outro lado, podem ainda ser observadas na figura algumas barras coloridas, onde cada cor está ligada a uma região do corpo e quanto maior a barra, maior será a quantidade desse microrganismo nessa região. (Morgan et al., 2013)

Com efeito, a análise deste mapa permite compreender quais os microrganismos mais abundantes no microbioma humano e qual a sua proporção em relação aos diferentes locais do corpo humano.

2.1. Tipos de microbioma

2.1.1. Cavidade oral

A cavidade oral é considerada um dos ecossistemas mais dinâmicos no corpo humano, albergando cerca de 50 a 100 biliões de bactérias, entre outros microrganismos como fungos e vírus, o que se define em aproximadamente 700 espécies bacterianas identificadas. Este ecossistema é constituído por várias estruturas como dentes, lábios, gengivas, entre outras, e cada uma delas é um nicho ecológico que promove o desenvolvimento de microrganismos, criando-se assim ambientes diferentes e levando ao desenvolvimento de diferentes microbiomas, o que é favorecido pelo consumo de açúcares e aminoácidos e a constante produção de saliva. A maioria destas bactérias são espécies comensais, mas dependendo da qualidade da higiene oral do indivíduo podem tornar-se patogénicas em resposta às mudanças do ambiente na cavidade. (Jenkinson and Lamont, 2005; Avila *et al.*, 2009)

Como seria de esperar existe uma grande variedade a nível do microbioma entre os vários sítios da cavidade oral, destacando-se as gengivas, a língua, o palato duro e o

palato mole e a superfície dos dentes, o que faz desta cavidade o local com maior índice de diversidade microbiana a seguir ao intestino. (Xu *et al.*, 2015)

Durante os primeiros dois meses de vida do bebé, as bactérias colonizam apenas a superfícies das mucosas e com a erupção dos dentes uns meses mais tarde começam a colonizar tecidos duros. Após esse tempo, o microbioma oral pode sofrer alterações constantes durante todas as fases da vida do indivíduo. (Struzycka, 2014)

Sendo a principal porta de entrada de microrganismos no corpo humano, tanto devido aos alimentos ingeridos como ao ar inspirado, os microrganismos da cavidade oral existem sob a forma de biofilmes organizados numa matriz extracelular complexa. Mais especificamente, os microrganismos estão envolvidas em polímeros orgânicos adsorvidos à superfície das estruturas orais, e são as adesinas microbianas que vão permitir a ligação do microrganismo à película salivar, às células do hospedeiro e à dentina exposta. Essa matriz constituída por produtos extracelulares microbianos e compostos salivares mantém o equilíbrio do ecossistema. Fatores físicos, ambientais e biológicos vão determinar o desenvolvimento destes biofilmes, que são caracterizados por serem bastante resistentes, sendo que alguns são até resistentes à penetração de antibióticos e à tensão mecânica. (Jenkinson and Lamont, 2005;Avila *et al.*, 2009;Dewhirst *et al.*, 2010;Chen *et al.*, 2010)

Estudos revelam que mais de 80% do microbioma oral é constituído por 200 espécies dos filos Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria, que juntamente com os géneros *Bacteroides* e *Fusobacterium*, perfazem um total de 95% de todas as espécies identificadas na cavidade oral. O género *Streptococcus* é o mais predominante, seguido por *Prevotella*, *Veillonella*, *Neisseria*, e *Haemophilus*. (Xu *et al.*, 2015;Ford *et al.*, 2007;Wang and Ganly, 2014)

Algumas bactérias, nomeadamente *Streptococcus*, ao fermentarem os açúcares produzem ácidos, os quais corroem o esmalte dentário, e quando os dentes não são limpos regularmente, o biofilme dentário acumula rapidamente podendo levar a uma cárie dentária. (Xu *et al.*, 2015)

Tendo uma extrema importância na manutenção do bem-estar oral, se o microbioma oral sofrer uma pequena alteração criando condições inadequadas tal pode

tornar-se prejudicial e levar a diversas situações patológicas. Alterações do ecossistema como alterações do pH e a presença de antibióticos podem desencadear estas situações. Para evitar doenças como periodontites ou cáries é necessário que o microbioma esteja em sintonia e equilíbrio com o hospedeiro. (Struzycka, 2014;Hajishengallis, 2015)

Nos últimos tempos têm-se provado várias teorias que associam a periodontite, a outras doenças sistémicas como as doenças cardiovasculares. Dados recentes apontam que a presença de *Porphyromonas gengivalis*, principal causadora de periodontites, tem sido associada ao aparecimento de aterosclerose, independentemente dos seus fatores de risco como obesidade, diabetes, hábitos tabágicos, hipercolesterolémia, hipertensão e até mesmo uma dieta rica em gorduras. (Hajishengallis, 2015;Dewhirst et al., 2010)

Sendo uma doença inflamatória crónica, a periodontite resulta de alterações no microbioma oral e causa desregulação imunitária e perda progressiva de massa óssea, pela acumulação de bactérias como as *Porphyromonas gengivalis*. Deste modo, observa-se uma produção de citocinas pró-inflamatórias que entrando na circulação poderão induzir uma resposta aguda no fígado, aumentando assim os níveis de proteína C reativa e fibrinogénio, o que contribui para eventos ateroscleróticos. (Bryan *et al.*, 2017;Hajishengallis, 2015)

De facto, foi já comprovado em estudos que com uma melhoria da saúde oral ocorre também um decréscimo na progressão de doenças cardiovasculares, logo isto vem confirmar o papel da periodontite como um fator de risco a ter em conta. (Hajishengallis, 2015)

2.1.2. Nasofaringe

Como já foi referido, cada região do corpo humano oferece um nicho ecológico diferente que condiciona o estabelecimento de um microbioma normal, o qual permanece normalmente constante.

No trato respiratório superior embora a maioria dos microrganismos que entram pelo ar inalado fiquem aprisionados nas passagens nasais e sejam expelidos pelas

secreções nasais, existe um grupo restrito de microrganismos que colonizam as superfícies das mucosas mais profundas. Um exemplo pleno disso é o facto de ser na nasofaringe que ficam aprisionados o maior número de microrganismos que são inalados. (Jourdain *et al.*, 2011b)

No microbioma da nasofaringe são encontradas as mesmas espécies que no microbioma oral, juntamente com outras como os géneros *Staphylococcus*, *Neisseria* e *Corynebacterium*. (Jourdain *et al.*, 2011b; Jourdain *et al.*, 2011a)

Muitas vezes em indivíduos com um microbioma da nasofaringe considerado normal, podem também ser encontrados alguns microrganismos potencialmente patogénicos, mas que no entanto não desenvolvem doenças no hospedeiro, pois os restantes microrganismos comensais competem com os patogénicos para que estes não consigam progredir. Além disso, o sistema imune do hospedeiro é especialmente activo nas superfícies das mucosas, ajudando a inibir o crescimento destes microrganismos patogénicos. São exemplo disso os *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma*, que não terão uma relação de comensalismo com o hospedeiro. (Ursell *et al.*, 2012a)

No trato respiratório inferior, nomeadamente brônquios e alvéolos pulmonares, não é comum encontrar bactérias uma vez que estas não o conseguem alcançar com facilidade, e se o fizerem existem defesas de primeira linha prontas a atacar a possível colonização, tal como os macrófagos alveolares. (Mahdavinia *et al.*, 2017)

2.1.3. Pele

Sendo o maior órgão do corpo humano, a pele tem como função principal servir de barreira física, protegendo o organismo contra agressões externas e possível colonização de microrganismos, dado que diariamente está em contacto com uma infinidade deles. (Rosenthal *et al.*, 2011)

A pele representa um habitat humano muito interessante, onde fatores ambientais e estilos de vida podem moldar de forma diferenciada a comunidade microbiana em

diferentes regiões específicas do corpo humano. Uma das principais características do microbioma da pele humana é a elevada diversidade e variação interpessoal, sendo esta concentração ligeiramente maior nos folículos pilosos, e este é extremamente importante para a saúde da mesma, uma vez que desempenha um papel essencial na sua proteção contra substâncias externas e potencialmente nocivas. (Grice and Segre, 2011)

Desta forma, o baixo pH da pele resultante da produção de ácidos durante a queratinização e da excreção de ácidos pelas células epiteliais e pelos microrganismos leva a que novos microrganismos não sobrevivam em condições tão inóspitas, tornando assim a pele uma barreira muito eficaz contra a colonização por microrganismos. Também a temperatura é outro fator que pode influenciar o microbioma, pois devido ao aumento da temperatura corporal, há produção de suor que vai alterar a percentagem de humidade à superfície da pele, e a consequente evaporação do suor vai aumentar a salinidade da pele, evitando que certos microrganismos proliferem, com destaque para as bactérias de Gram negativo. (Rosenthal et al., 2011)

Desta forma, e conjugando todos os fatores descritos com os diversos microambientes, temos diferentes populações microbianas nas várias regiões da pele.

A comunidade microbiana cutânea é específica de cada região do corpo humano, de cada indivíduo e de cada raça, sendo bastante estável ao longo do tempo, apesar da constante exposição a diferentes meios ambientes. Assim, em vez de serem adquiridos os microrganismos prevalentes no meio ambiente, os hospedeiros mantêm o seu microbioma que acaba por funcionar como uma impressão digital microbiana única para cada pessoa.

Tal como se pode observar na figura 2, os quatro filos dominantes residentes na pele são Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, e os géneros de bactérias mais predominantes são *Staphylococcus*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium*, sendo que cada um está concentrado de forma diferente entre os vários locais da pele. (Hannigan and Grice, 2013; Gao et al., 2007)

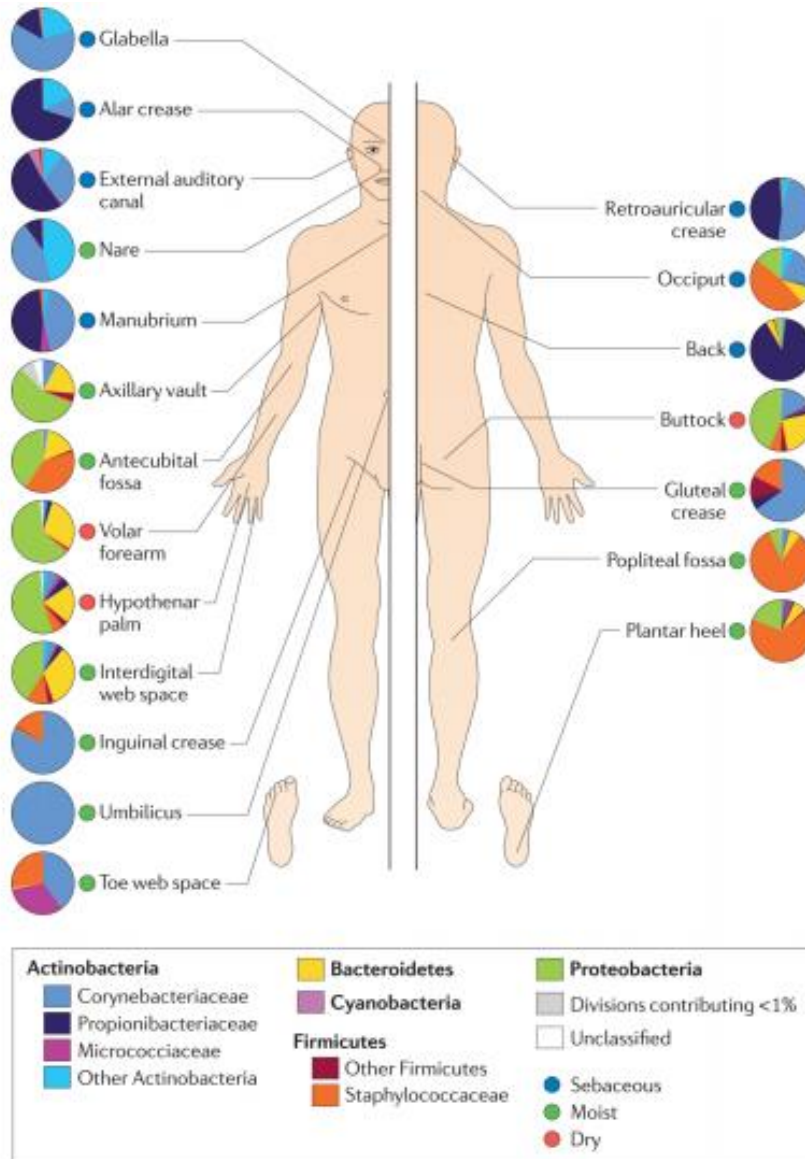


Figura 2 – Distribuição topográfica do microbioma cutâneo e a sua associação aos microambientes (Grice and Segre, 2011)

Áreas com elevada densidade de glândulas sebáceas tais como costas, face, peito e área atrás das orelhas tendem a ser colonizadas por grandes quantidades de microrganismos lipofílicos, como *Propionibacterium*, isto porque estas bactérias hidrolisam os triglicéridos encontrados nas glândulas sebáceas, libertando depois ácidos gordos livres na pele, que a acidificam e a tornam mais macia, funcionando como um

emoliente. Para além disto, estas áreas tendem a ter baixos graus de diversidade relativamente a zonas secas e húmidas.(Grice *et al.*, 2009;Grice, 2015)

O papel do sebo na definição do microbioma cutâneo pode ser refletido nas alterações associadas à idade na composição e diversidade deste microbioma. Após o nascimento, os bebés são colonizados por mais bactérias do filo Firmicutes do que Actinobacteria. Geralmente, com a maturação das glândulas sebáceas associada à puberdade coincide uma mudança no microbioma da pele com um aumento de Actinobacteria, incluindo *Corynebacterium* e *Propionibacterium*. Esta mudança associada à idade pode ser um fator preponderante na diminuição da incidência e severidade de doenças de pele maioritárias da infância, tal como dermatite atópica. Os fungos presentes no microbioma de áreas sebosas tendem a ser menos diversos do que as comunidades bacterianas, sendo que a espécie dominante é a *Malassezia*. (Capone *et al.*, 2011;Oh *et al.*, 2012)

Zonas húmidas ou oclusivas da pele têm por norma uma comunidade microbiana composta por bactérias de Gram positivo como *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, que preferem altas concentrações de humidade no seu habitat como as encontradas no umbigo, nas axilas, nas virilhas, na zona posterior do joelho e na zona interna do cotovelo. Nestes locais, a humidade, a temperatura mais elevada e a concentração de lípidos cutâneos vão favorecer o crescimento do microbioma. As bactérias do género *Staphylococcus* ocupam um nicho aeróbio e pensa-se que usam a ureia presente no suor como fonte de nitrogénio. (Holland and Bojar, 2002)

As zonas que apresentam maior diversidade são as áreas secas como o antebraço, os cotovelos, os joelhos, as nádegas e as várias partes da mão. Nesta predominam grandes quantidades de Proteobacteria e Bacteroidetes, mas também algumas Firmicutes e Actinobacteria, em comparação com as zonas húmidas e sebáceas. É nestas zonas que se observam problemas cutâneos como a psoríase, que resulta de uma falha na tolerância imune ao microbioma. (Costello *et al.*, 2009;Grice *et al.*, 2009)

As espécies microbianas mais predominantes na pele são bactérias de Gram positivo, onde o *Staphylococcus epidermidis* tem especial destaque constituindo quase 100% da comunidade bacteriana nesta superfície. Esta bactéria é maioritariamente

inofensiva, no entanto caso invada outras regiões poderá tornar-se nociva, como por exemplo quando há introdução de cateteres no organismo, a bactéria pode invadir o hospedeiro e causar infecções nosocomiais, através da formação de um biofilme que a vai proteger de respostas imunes e da ação de antibióticos. (Grice and Segre, 2011)

Desta forma, pode-se dizer que as áreas expostas e secas possuem um número relativamente pequeno de residentes, enquanto as áreas húmidas têm uma população muito mais numerosa. Nas seguintes tabelas poderemos encontrar alguns dos microrganismos que colonizam a pele e quais as suas interações com a mesma.

Tabela 1 – Ação de alguns microrganismos da pele e suas interações (adaptado de (Grice, 2015))

Microrganismos da pele	
<i>Propionibacterium acnes</i>	- Induz respostas inflamatórias, interagindo com queratinócitos e células produtoras de sebo
<i>Staphylococcus aureus</i>	- Forma um biofilme e adere ao tecido cutâneo produzindo toxinas que podem desencadear respostas inflamatórias
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	- Sustenta o escudo protetor da pele - Controla a proliferação de bactérias potencialmente patogénicas como a <i>Staphylococcus aureus</i>

A utilização de antibióticos, de cosméticos e produtos de higiene pessoal, bem como os estilos de vida e os hábitos alimentares são fatores que também podem influenciar o microbioma da pele.

Embora a maioria destes microrganismos seja inofensiva ou benéfica, alguns têm sido ultimamente associados a doenças da pele como acne, psoríase e eczema. Deste modo, o estudo da variabilidade destas comunidades microbianas nos seus diversos locais do corpo humano tem ajudado a compreender qual a razão do eczema se manifestar em zonas húmidas, como nas zonas de dobras dos braços e pernas, e a psoríase ocorrer em zonas mais secas, como cotovelos e joelhos.

2.1.4. Trato Gastrointestinal

A grande e diversificada colonização do trato gastrointestinal humano começa desde cedo. O ecossistema bacteriano gástrico e intestinal de um adulto contém um complexo conjunto de microrganismos com mais de 100 triliões de células microbianas entre as quais mais de 1000 espécies bacterianas. (Qin *et al.*, 2010)

A colonização do trato gastrointestinal começa logo após o nascimento, através do contacto materno. Ao longo das primeiras semanas este vai-se tornando mais diverso e vai sofrendo alterações, até que estabiliza por volta dos 2 a 3 anos de idade, quando já é muito semelhante ao microbioma gastrointestinal de um adulto. (Koenig *et al.*, 2011)

Respeitante ao microbioma do estômago, o facto de este órgão ter um pH bastante ácido e de secretar pepsinogénio na sua mucosa, leva a que qualquer possível colonização seja impedida, pois os microrganismos são totalmente destruídos., o que leva a que a taxa populacional seja mantida muito baixa resultante das condições ambientais adversas. As únicas espécies que são resistentes ao ácido presente no estômago, o ácido clorídrico, são *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Helicobacter pylori*, podendo no entanto esta última provocar gastrites crónicas ativas, úlceras pépticas, ou mesmo neoplasias. (Costello *et al.*, 2009; Wolvers *et al.*, 2010)

O microbioma intestinal tem várias funções e interage com o hospedeiro muito mais do que apenas ser um suporte fisiológico no processo de digestão de alimentos. Este faz parte e regula a barreira de mucosa intestinal, controla a absorção de nutrientes e o metabolismo, ajuda na maturação de tecidos imunológicos, e previne a propagação de microrganismos. Sob condições fisiológicas, o microbioma continua a estimular o sistema imunitário, dado que este é um eficaz mecanismo de defesa contra agentes estranhos ao organismo. (Barko *et al.*, 2017)

A composição do microbioma intestinal é extraordinariamente diversa e dinâmica em curtos períodos de tempo, isto porque a ingestão de alimentos ou medicamentos afeta significativamente a comunidade microbiota. No entanto, a sua composição aparenta ficar estável ao longo do tempo entre indivíduos e os seus membros familiares mais próximos. Apesar da ingestão diária de microrganismo através da alimentação, esta população permanece relativamente constante, sendo necessários fatores exógenos para perturbar o equilíbrio do microbioma comensal, tal como presença de bactérias patogénicas ou o uso de antibióticos. (Yamashita *et al.*, 2016; Dominguez-Bello *et al.*, 2011)

A maioria dos nutrientes consumidos através da dieta são processados por uma grande variedade de enzimas humanas antes de serem absorvidos no intestino delgado, no entanto o microbioma intestinal contribui para o metabolismo das fibras que normalmente não são digeridas por estas enzimas. No intestino grosso, um grupo de microrganismos incluindo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, contribuem para a fermentação de polissacarídeos derivados de plantas, de fibras, de oligossacarídeos e proteínas não digeríveis, e mucinas intestinais para constituírem fontes de energia para o hospedeiro. (Arora and Sharma, 2011; Flint *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 2011)

Para além do seu papel na digestão de certos alimentos, o microbioma intestinal desempenha um papel vital para impedir a invasão de certos patogéneos, criando para tal uma resistência microbiana, contribui para a educação e estimulação do sistema imunitário, mantém a integridade do epitélio intestinal e a homeostasia, bem como aumenta a motilidade do trato gastrointestinal. As bactérias que compõem o microbioma do cólon também são responsáveis por sintetizar vitaminas como a B12, a K, a biotina, a tiamina e o ácido fólico. (Dominguez-Bello *et al.*, 2011; Prakash *et al.*, 2011)

A maioria dos microrganismos que compõem esta comunidade são as bactérias anaeróbias dos filos Bacteroidetes e Firmicutes, que desempenham um papel fundamental na digestão dos alimentos e ocupam um nicho de cerca de 90% do microbioma gastrointestinal. Depois há ainda microrganismos do filo Actinobacteria (família Bifidobacteriaceae) e Proteobacteria (família Enterobacteriaceae), embora em quantidades muito mais diminutas. Ainda podemos encontrar outras bactérias pertencentes a outros filos, como Fusobacteria e as Euryarchaeota (reino Archaea), representando uma pequena percentagem do microbioma intestinal.

O peristaltismo intestinal, o ácido clorídrico que provém do estômago e a concentração elevada em sais biliares levam a que haja uma contagem baixa de microrganismos no intestino delgado. À medida que se vai progredindo no duodeno até ao íleo, a densidade bacteriana vai aumentando, sendo que no começo do intestino delgado existem uma flora muito semelhante à presente no estômago, enquanto na parte terminal do intestino delgado está presente uma flora em tudo parecida com a do intestino grosso. (Tsukumo *et al.*, 2015)

Com base na figura 3, quando se analisam as porções mais proximais do intestino, pode verificar-se que as bactérias mais frequentemente encontradas no duodeno e no jejuno são dos géneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*, muito semelhante ao microbioma encontrado no estômago, pois estas estruturas encontram-se muito próximas, e no duodeno existem as secreções biliares e pancreáticas que são responsáveis pela acidez. (Sartor, 2008)

A porção seguinte, o íleo, já apresenta um microbioma moderado com predomínio dos géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*, e no cólon pode ser encontrada uma população maior e mais complexa de microrganismos anaeróbios como *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Clostridium*, isto porque há uma diminuição progressiva da acidez, permitindo a existência de mais microrganismos. É assim que no cólon existe uma maior diversidade microbiana entre indivíduos, e por isso é o local ideal para que ocorra a fermentação entre os microrganismos do microbioma e os nutrientes provenientes da digestão dos alimentos. (Prakash *et al.*, 2011; Sartor, 2008)

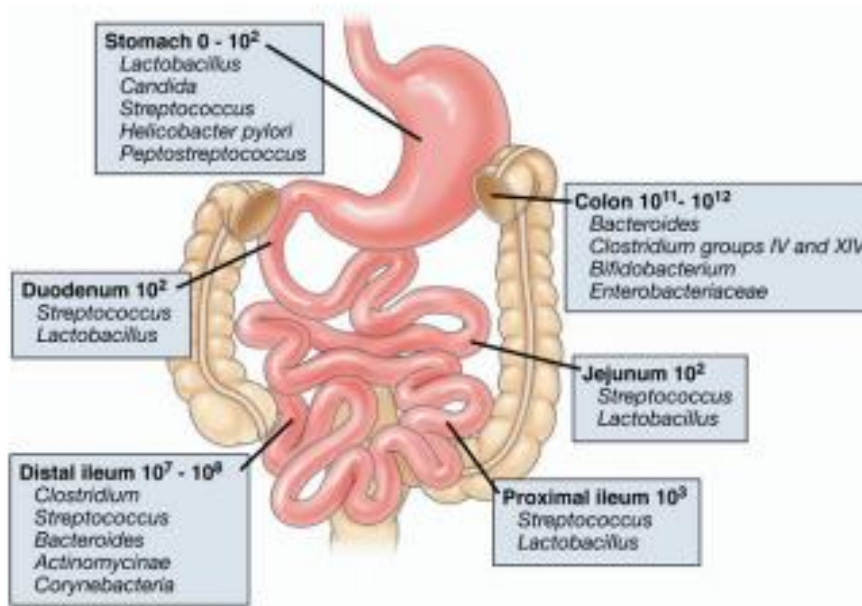


Figura 3 – Composição e concentração do microbioma, de algumas regiões do trato gastrointestinal (imagem retirada de (Sartor, 2008))

Todas estas bactérias, por norma são comensais, no entanto em indivíduos imunodeprimidos ou debilitados podem tornar-se patogénicas, mesmo que em pequenas quantidades.

Por fim, chegou-se à conclusão que o que vem dar origem a uma doença não é um microrganismo em específico, mas sim um desequilíbrio do microbioma intestinal que pode envolver vários microrganismos ao mesmo tempo, e a que se dá o nome de disbiose. Esta tem implicações ao nível da saúde humana, levando a uma variedade de doenças como as doenças inflamatórias intestinais, cancro, distúrbios metabólicos, e ainda as doenças cardiovasculares, que é o assunto chave desta dissertação. (Parfrey and Knight, 2012)

2.1.5. Trato urogenital

O trato urinário e o trato genital encontram-se intrinsecamente ligados, pelo que muitas vezes se podem denominar por trato urogenital.

O trato urinário é normalmente um meio estéril e resistente à colonização bacteriana apesar da frequente contaminação da uretra distal, mas nos últimos tempos as inovações tecnológicas vieram permitir adquirir novos conhecimentos à luz deste tópico. Agora sabe-se que também na bexiga existe um microbioma residente, que se em equilíbrio nada negativo faz ao organismo. (Whiteside *et al.*, 2015)

A principal defesa contra infeções do trato urinário é o fluxo de urina, principalmente durante o esvaziamento completo da bexiga, onde através da micção as bactérias que invadem a bexiga são eliminadas. Além disso, a urina possui outros mecanismos de defesa antimicrobiana como a elevada concentração de ureia, o pH ácido, e as várias barreiras imunológicas. Mas para além desta defesa, a proteção dos órgãos superiores do sistema urinário contra a colonização de bactérias provenientes da vagina ou da superfície do pénis é garantida pela ação de um esfíncter na zona uretral, que vai funcionar como barreira à entrada de microrganismos. (Whiteside *et al.*, 2015; Chung and Kasper, 2010)

Estima-se que a diversidade do microbioma urinário seja muito comparável à diversidade do microbioma vaginal, sendo composto na sua maioria por *Lactobacillus*, mas também alguns *Staphylococcus*, *Streptococcus* e possivelmente uma quantidade residual de *Echerichia coli*, presentes maioritariamente na uretra distal. No entanto, poderá haver ainda colonização transitória por parte de microrganismos fecais como as enterobactérias, o que pode levar a infeções do trato urinário superior. (Pearce *et al.*, 2014; Karstens *et al.*, 2016)

Tal como no microbioma intestinal, este tem um papel importante no equilíbrio do sistema urinário, sendo a degradação de compostos tóxicos, a manutenção da impermeabilidade das mucosas, a ativação do sistema imunitário e a produção de compostos antimicrobianos alguns dos mais importantes. (Chung and Kasper, 2010; Siddiqui *et al.*, 2011)

Falando agora do trato genital, o microbioma vaginal há muito que tem sido considerado um importante mecanismo de defesa contra infecções em mulheres. Sendo alvo de variadas modificações devido à idade e aos fatores hormonais da mulher, a vagina apresenta uma grande diversidade microbiana. Antes da puberdade, este microbioma é constituído na sua maioria por *Streptococcus*, *Staphylococcus* e algumas *Escherichia coli*, sendo que ao atingir esta etapa começa a produção de estrogénios, levando a que *Lactobacillus* passe a ser a espécie predominante e a contínua produção de ácido láctico seja responsável pela acidificação do pH vaginal, impedindo novos microrganismos de colonizarem., sejam bactérias, fungos ou vírus. Simultaneamente, estes microrganismos vão produzir substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogénio que inibe a propagação de vírus e o crescimento de bactérias e fungos, vão estimular o sistema imune vaginal, estimulando os mecanismos de defesa locais, e vão formar um biofilme que evita o acesso de agentes patogénicos à mucosa vaginal. Nesta fase é habitual que o microbioma para além de *Lactobacillus* tenha ainda *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Bacteroides*. (Ursell et al., 2012b)

Durante a gravidez o microbioma é caracterizado por um aumento de uma ou duas espécies de *Lactobacillus*, mantendo-se quase sempre estável e menos sujeito a variações, também devido à produção de ácido láctico, sendo considerado um mecanismo de defesa. Na menopausa, há uma diminuição na produção de estrogénios e glicogénio, pelo que o microbioma vaginal passa a ter um pH de cerca de 7, e a composição passa a ser muito semelhante àquela que havia no período pré-puberdade, sendo colonizado maioritariamente por *S. epidermidis*, *Streptococcus* e *E.coli*. (Ling et al., 2010;Walther-Antonio et al., 2014)

Além destas modificações, sabe-se também que o microbioma genital varia de acordo com a etnia da população. Estudos recentes vieram comprovar que em mulheres de diferentes etnias em todo o mundo, desde caucasianas, asiáticas, hispânicas, afro-americanas, entre outras, foram encontradas comunidades microbianas muito semelhantes a nível vaginal, sendo bastante notável a predominância de *Lactobacillus*, com especial destaque para *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii*. O que também se verificou com este estudo foi que em mulheres asiáticas e caucasianas há um domínio maior de bactérias produtoras de ácido láctico em relação às hispânicas e afro-americanas,

pelo que assim pode ser explicado o porquê destas primeiras terem um pH vaginal mais baixo do que as segundas. (Ravel *et al.*, 2011)

Numa perspectiva geral, tanto os distúrbios no microbioma genital como no urinário partilham os mesmos fatores de risco, como o uso de antibióticos, as relações sexuais não protegidas, o uso de diafragmas, a promiscuidade sexual, entre outros que vão alterar a flora e conduzir a possíveis quadros de infecção, sendo mais provável estas acontecerem em mulheres do que em homens, isto porque eles têm alguns fatores protetores, como a distância entre as duas estruturas anatómicas, o comprimento da uretra masculina e ainda a atividade antimicrobiana do fluido prostático.

2.2. Evolução do microbioma ao longo da vida

Durante a gravidez e até ao momento do nascimento, o ser humano é composto apenas pelas suas células somáticas e é mantido num ambiente estéril. Mas, após o nascimento, o recém-nascido é exposto a uma grande variedade de microrganismos como bactérias, fungos, vírus, entre outros, muitos dos quais são fornecidos pela mãe durante e após a passagem pelo canal vaginal, um ecossistema fortemente colonizado por um conjunto relativamente limitado de bactérias, ou minutos após uma cesariana pelos microrganismos da pele da mãe. Começa-se, assim, cedo a construir um microbioma positivo para a vida futura. (Morgan *et al.*, 2013; Ursell *et al.*, 2013; Dominguez-Bello *et al.*, 2011)

Um novo ecossistema microbiano começa a ser formado no organismo do novo ser humano, e este desenvolve-se desde os primeiros dias de vida, tornando-se essencial nos processos de reconhecimento e tolerância imunológica. O seu perfil depende do tipo de parto (normal ou cesariana) e da fórmula de aleitamento (materno ou fórmulas lácteas), criando as mais variadas formulações de microbioma. Assim, a variação interpessoal na diversidade microbiana intestinal é maior entre lactentes do que entre adultos. (Dominguez-Bello *et al.*, 2011; Koenig *et al.*, 2011)

O início do desenvolvimento do microbioma humano começa durante o nascimento, com a colonização de microrganismos através do meio ambiente. Nas

primeiras horas de vida, os microrganismos presentes na flora vaginal e fecal da mãe são normalmente as mais importantes fontes de inóculo. O tipo de parto pode levar a diferenças no desenvolvimento do microbioma, o que poderá depois contribuir em variações na fisiologia normal do organismo do hospedeiro ou até mesmo na predisposição de doenças. (Dominguez-Bello et al., 2011)

Quando ocorre um parto normal, o recém-nascido será colonizado pelas bactérias que estão presentes no canal vaginal da mãe, como *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Sneathia*. Por outro lado, quando há uma cesariana, os microrganismos que vão colonizar o recém-nascido serão semelhantes aos da pele da mãe, nomeadamente *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*. Assim, as comunidades bacterianas só se diferenciam ao longo dos anos com o aparecimento de novas espécies e com a evolução das mesmas, tornando-as distintas umas das outras. (Siezen and Kleerebezem, 2011)

Durante os primeiros meses de uma dieta láctea, as diferentes fórmulas de aleitamento vão influenciar a quantidade e diversidade de microrganismos encontrados no microbioma do recém-nascido. Através da amamentação com leite materno há um domínio de bactérias como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*, sendo estas últimas as responsáveis pela proteção do bebé, pois estão altamente adaptadas para processar os oligossacarídeos do leite, metabolizando os açúcares em ácidos, e contribuindo para a inibição competitiva com outras bactérias pela adesão à mucosa intestinal, o que vai conferir proteção contra agentes patogénicos intestinais. Por outro lado, a quantidade de bifidobactérias é significativamente menor em lactentes alimentados com fórmulas infantis, onde vão predominar outras bactérias como *Escherichia coli* e *Bacteroides*. Assim, pode-se dizer que o leite materno é fundamental na prevenção de disbioses e possíveis doenças mais complicadas no futuro. (Tsukumo et al., 2015)

Mas não só estes dois fatores influenciam o tipo de microbioma encontrado nos recém-nascidos, pois dependendo da região geográfica em que determinado bebé se encontra, este vai apresentar um microbioma completamente distinto, refletindo o impacto ambiental e as condições sanitárias da zona. Também o uso de antibióticos vai modular muito o microbioma infantil, criando grandes disparidades entre os lactentes. (Prakash et al., 2011; Gerritsen et al., 2011; Rodriguez et al., 2015)

A introdução de comidas sólidas e o desmame anunciam uma mudança para o ecossistema de microrganismos, levando a que comece cada vez mais a ficar parecido com o microbioma de um adulto. E assim, no primeiro ano de vida, o trato gastrointestinal progride de um estado praticamente estéril para uma colonização extremamente densa, terminando com uma comunidade muito semelhante à encontrada no trato gastrointestinal de um adulto. Os microrganismos a que a criança vai estar exposta são assim importantes para a maturação da sua flora. (Fiocchi *et al.*, 2012)

Durante a puberdade, mudanças na produção de sebo acontecem ao mesmo tempo que os níveis de bactérias lipofílicas à superfície da pele aumentam. Diferenças fisiológicas e anatómicas entre indivíduos do sexo feminino e masculino tais como produção de suor, de sebo e de hormonas são parte constituinte nas grandes mudanças vistas entre géneros, a partir da puberdade. (Giacomoni *et al.*, 2009)

Com o avançar da idade começam a haver grandes mudanças em todo o organismo, pelo que o microbioma não é exceção. A quantidade de microrganismos presentes no organismo começa a diminuir drasticamente, especialmente as bactérias anaeróbias presentes no intestino, como é o caso de *Bifidobacterium* que atuam como protetoras do trato intestinal, mas também se nota uma diminuição na produção de ácidos gordos de cadeia curta e um aumento da atividade proteolítica, comprometendo o funcionamento do sistema digestivo. Para além disto, com o envelhecimento há também um aumento significativo de enterobactérias que podem vir a ser consideradas patogénicas. (Tsukumo *et al.*, 2015; Siezen and Kleerebezem, 2011; Claesson *et al.*, 2012; Mariat *et al.*, 2009)

2.3. Fatores que influenciam o microbioma

O processo de colonização começa cedo e estabiliza por volta dos 3 anos de idade, mas há vários fatores que podem influenciar o microbioma, levando a uma alteração que pode ser benéfica ou não. Intervenções terapêuticas, a alimentação, a genética, o uso de antibióticos, as condições de higiene, o estilo de vida e os hábitos alimentares são alguns

desses fatores que têm importância para as populações de bactérias que se encontram no organismo. (Nelson *et al.*, 2015)

A plasticidade do microbioma tem sido implicada em numerosas condições patológicas e a uma alteração não favorável do microbioma residente é dado o nome de disbiose, que pode dever-se a vários fatores como dieta, aumento de stress ou de marcadores inflamatórios e o uso de antibióticos. Esta alteração parcial ou completa do microbioma humano pode prejudicar a homeostasia do ecossistema, levando a um novo estado caracterizado pelo aparecimento de vários fatores patológicos no hospedeiro, tal como bactérias potencialmente perigosas. Estas alterações podem assim explicar porque é que alguns indivíduos são mais propensos a desenvolver certas doenças. (Honda and Littman, 2016; Lippi *et al.*, 2017)

Um estilo de vida saudável é fundamental para a conservação do microbioma e da saúde humana, no entanto o sedentarismo, o stress, o tabaco e os excessos alimentares põem também em risco o equilíbrio do organismo.

Uma das maiores preocupações nos dias de hoje são as recentes inovações no estilo de vida, nomeadamente as mudanças da dieta ocidental que passou a ter um maior teor de gordura e açúcar, o que vai influenciar a estrutura e atividade dos microrganismos residentes. Essas alterações induzidas pela dieta são suspeitas de contribuir para o desenvolvimento de doenças crónicas, incluindo as doenças cardiovasculares e a obesidade. Segundo um estudo, após um pequeno período de tempo com uma dieta diferente da habitual, começam logo a notar-se as alterações na composição e atividade do microbioma intestinal. (David *et al.*, 2014)

Um exemplo disso é que o aumento na ingestão de fibras vai aumentar o trânsito intestinal, pois vai haver o aumento de substratos fermentáveis no intestino, como ácidos gordos de cadeia curta, o que leva a uma diminuição do pH do lúmen intestinal e com isto observa-se um aumento do número de microrganismos do filo Firmicutes. Também o consumo de uma dieta rica em gorduras tem demonstrado induzir disbiose no intestino, reduzindo a integridade intestinal. (Salonen and de Vos, 2014)

Alguns ácidos gordos livres, como o ácido palmítico, prejudicam a permeabilidade intestinal, resultando numa absorção intestinal aumentada de lipopolissacarídeos e outros componentes indutores de inflamação, terminando com uma endotoxemia metabólica ou uma inflamação.

Devido à imensa capacidade metabólica do microbioma, à sua elevada plasticidade e ao crescente conhecimento da sua composição, o microbioma humano pode ser facilmente modulado através da otimização da dieta, procurando-se com esta criar intervenções alimentares terapêuticas para restaurar o microbioma e prevenir ou tratar doenças provenientes de um quadro de disbiose. (Salonen and de Vos, 2014)

Na figura 4 está demonstrado que a ingestão de alimentos sejam proteínas, lípidos, hidratos de carbono, polifenóis e pre ou probióticos, vai alterar o microbioma intestinal, o que vai causar efeitos biológicos desde a alteração no metabolismo, sistema imune e produção de metabolitos pro e anti-inflamatórios. Tais modificações vão provocar no organismo humano doenças como doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2, obesidade, síndrome metabólico, e doenças autoimunes.

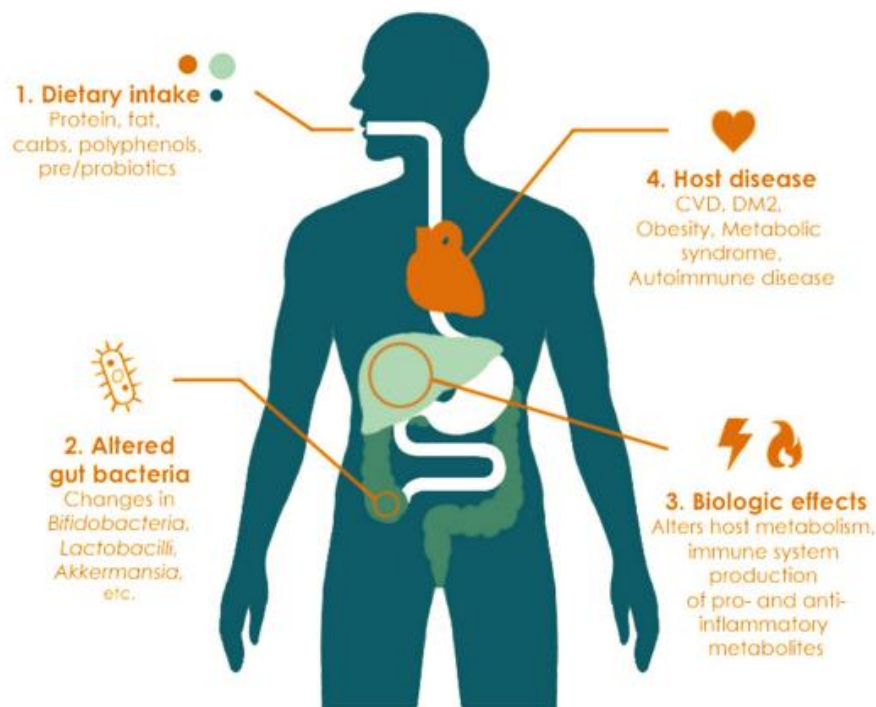


Figura 4 – Influência da dieta no microbioma intestinal e na saúde humana (retirado de (Singh *et al.*, 2017))

Os agentes patogénicos têm repetidamente adquirido a capacidade genética para sobreviverem a tratamentos com antibióticos, resultante do uso generalizado dos mesmos. A incidência de infeções resistentes a antibióticos está a aumentar rapidamente, enquanto a taxa de descoberta de novos antibióticos está a diminuir de tal forma que este está a tornar-se um dos problemas mais graves do século XXI. Além do desenvolvimento de resistências, o uso descontrolado de antibióticos perturba fortemente a ecologia do microbioma humano, e este não vai desempenhar as suas funções vitais, tais como o fornecimento de nutrientes, a produção de vitaminas e a proteção contra agentes patogénicos. Os antibióticos podem afetar o microbioma humano dependendo do seu espectro de ação, da via de administração que é usada, da sua dosagem e do tempo de tratamento. Os antibióticos de largo espectro podem causar o desequilíbrio do microbioma humano, criando circunstâncias favoráveis para o sobrecrescimento de espécies potencialmente patogénicas, e a seleção de estirpes resistentes aos antibióticos. (Jernberg *et al.*, 2010;Langdon *et al.*, 2016)

Além do aumento da ameaça da resistência aos antibióticos, causada pelo seu uso excessivo, os seus efeitos colaterais deixam claro que o uso descontrolado de antibióticos de largo espectro deve ser rapidamente controlado, favorecendo abordagens mais precisas que devem ser complementadas com métodos para restaurar o microbioma.

3. Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são doenças que se caracterizam por afetar o coração e os vasos sanguíneos, desde artérias, veias e capilares e que estão intrinsecamente ligadas a um conjunto de fatores de risco. Estas podem ser de vários tipos, sendo as mais preocupantes as doenças das artérias coronárias e das artérias cerebrais. Os fatores de risco associados a estas doenças estão descritos na figura seguinte.



Figura 5 – Fatores de risco associadas às doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares continuam a ser a maior causa de mortalidade e morbidade nos países desenvolvidos, sendo responsáveis por uma em cada três mortes nos Estados Unidos da América e uma em cada quatro mortes na Europa. Além disso, o aumento constante de fatores de risco comuns nas doenças cardiovasculares obriga a uma procura de estratégias mais eficazes para prevenir e modificar o curso destes distúrbios. (Mozaffarian, 2016)

Recentemente, descobriu-se o papel interessante do microbioma humano nas doenças cardiovasculares, comprovando-se que a sua manipulação pode afetar o metabolismo do hospedeiro. Esses estudos sugerem que o microbioma intestinal produz inúmeros metabolitos, alguns dos quais são absorvidos pela circulação sistémica, sendo uns ativados metabolicamente e outros metabolizados por enzimas do hospedeiro, servindo de mediadores da influência do microbioma no hospedeiro. (Wang *et al.*, 2011)

Apesar de existirem muitas evidências epidemiológicas que apoiam a associação entre a flora bacteriana intestinal e as doenças cardiovasculares, a explicação patogénica subjacente é ainda muito imprecisa. Vários mecanismos têm sido estudados como a causa desta relação, dos quais se destacam a predisposição para a diabetes ou obesidade, a modulação do sistema imunitário e ainda o metabolismo de ácidos gordos de cadeia curta, de ácidos biliares e outros compostos polifenólicos, quando estes estão comprometidos. No entanto, a explicação que mais sobressai entre todas as informações disponíveis para explicar esta associação é a que diz respeito ao N-óxido de trimetilamina. (Tang *et al.*, 2017)

O TMAO é um composto orgânico incolor que pertence ao grupo das aminas oxidases. Esta é produzida no intestino e depende da formação inicial do composto trimetilamina (TMA) pelo microbioma presente, especialmente na primeira porção do intestino grosso. [Figura 6]

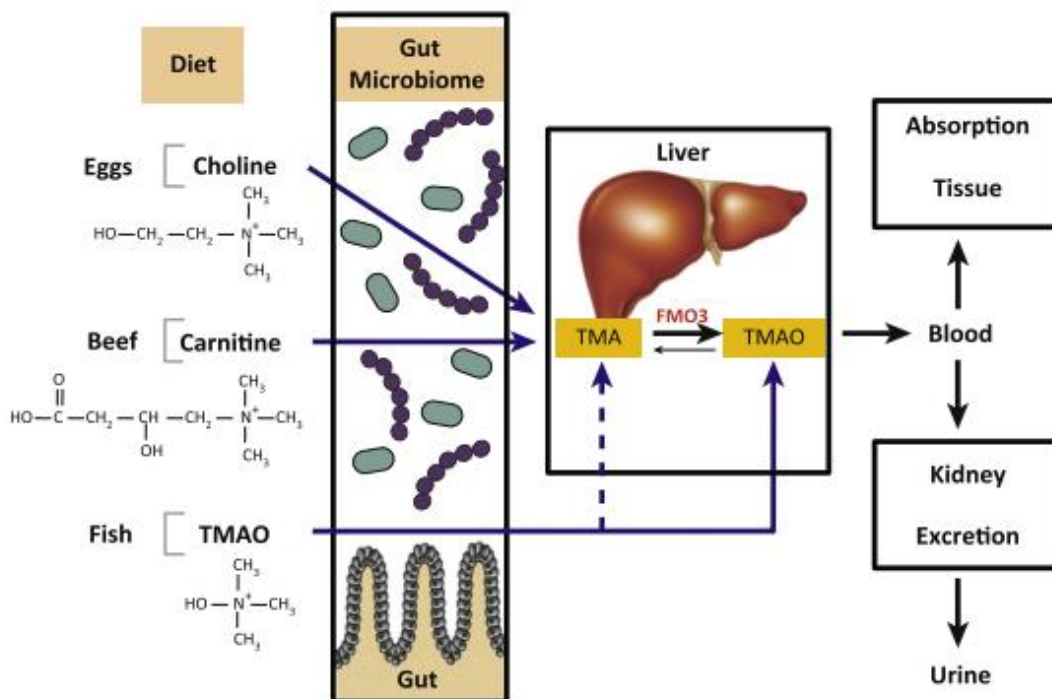


Figura 6 – Diagrama simplificado da formação e metabolismo do N-óxido de trimetilamina (retirado de (Cho and Caudill, 2017))

A trimetilamina é um produto do metabolismo da dieta pelos microrganismos presentes no microbioma intestinal e geralmente está associada ao consumo de alimentos que contêm colina e lecitina, como os ovos, as carnes vermelhas, os laticínios e alguns vegetais, alimentos que contêm carnitina, como bebidas energéticas e carnes, ou até alimentos que contêm TMAO, como alguns peixes e frutos do mar. A conversão da colina em TMA é catalisada por uma liase, uma enzima radicalar glicada codificada por genes presentes em bactérias dos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. (Cho and Caudill, 2017; Bain *et al.*, 2005)

De seguida, a TMA é absorvida no intestino, entrando na circulação sanguínea e seguindo para o fígado, onde será oxidada por enzimas hepáticas flavinas mono-oxidases (FMO) em N-óxido de trimetilamina. Esta última pode ser libertada pelo fígado e ser absorvida pelos tecidos extra-hepáticos ou ser excretada pela urina, pelo suor ou pela respiração. É também absorvida pelos macrófagos no processo de formação da placa aterosclerótica e assim elevados níveis de TMAO estão associados a um risco aumentado de doenças cardiovasculares, com ou sem influência dos fatores de risco. (Tang and Hazen, 2017a; Gaci *et al.*, 2014; Koeth *et al.*, 2013)

Para além do que já foi dito, o N-óxido de trimetilamina vai aumentar a libertação dos íons cálcio (Ca^{2+}) devido à estimulação da atividade plaquetária, o que por sua vez vai ativar as vias protrombóticas. Esta molécula vai também regular a diferenciação de monócitos em macrófagos e células espumosas, e vai influenciar processos pro-fibróticos no coração e nos rins, através de fatores de crescimento. (Brown and Hazen, 2018)

Uma ligação entre o TMAO e o risco de doença cardiovascular surgiu quando os investigadores descobriram uma associação dose-dependente, entre as concentrações plasmáticas de TMAO, bem como de colina e betaína, e o risco de doenças cardiovasculares em pacientes cardíacos. O mecanismo pelo qual o TMAO pode contribuir para a progressão destas doenças envolve o aumento da acumulação de colesterol nos macrófagos. (Tang and Hazen, 2017b)

Estudos recentes sugerem que os microrganismos intestinais levam ao desenvolvimento de aterosclerose, e a potência pro-aterogénica do TMAO foi já demonstrada em estudos que vieram comprovar que este composto é capaz modificar o

metabolismo do colesterol e do esterol, suprimindo o transporte reverso do colesterol. Isto leva a uma acumulação de colesterol nos macrófagos, promovendo a ativação de células endoteliais e a migração de células espumosas para as paredes das artérias, e ainda desencadeando a ativação plaquetária. Independentemente dos mecanismos, o papel crucial desempenhado pelo TMAO fornece uma explicação adicional e razoável para os efeitos negativos na saúde cardiovascular, a partir de vários alimentos ricos em fosfatidilcolina como carne vermelha, peixe, leite, gema de ovo e soja. Tudo isto está resumido na figura 7. (Bennett *et al.*, 2013;Warrier *et al.*, 2015;Lippi *et al.*, 2017)

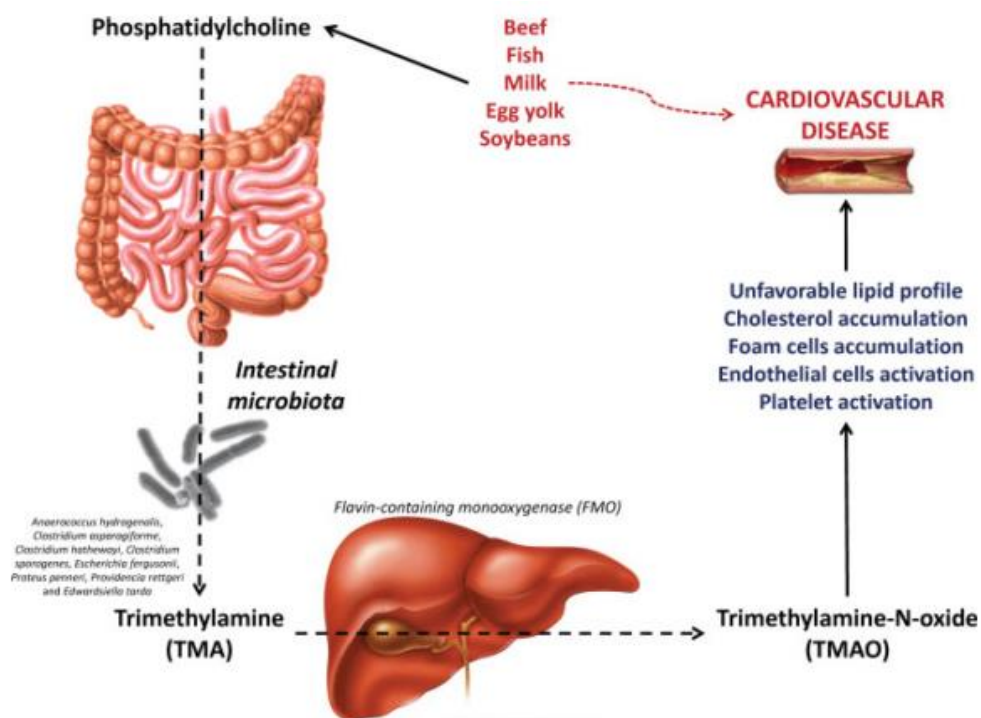


Figura 7 – Relação entre a alimentação, o microbioma humano e as doenças cardiovasculares. (retirado de (Lippi *et al.*, 2017))

As bactérias produtoras de TMA são *Anaerococcus hydrogenalis*, *Clostridium asparagiforme*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia fergusonii*, *Proteus penneri*, *Providencia rettgeri* e *Edwardsiella tarda*.

Outros mecanismos pelos quais o TMAO pode contribuir para a patogênese das doenças cardiovasculares incluem o prolongamento do efeito hipertensivo da angiotensina II e o aumento da atividade plaquetária que contribui para um potencial efeito trombótico.

Os ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) são ácidos carboxílicos com menos de seis carbonos, produzidos através da fermentação de hidratos de carbono e proteínas por bactérias como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, presentes no trato gastrointestinal, e desempenham um papel importante na formação do ecossistema microbiano e na alteração da imunidade do hospedeiro. Desta forma, a composição da dieta influencia diretamente a produção de SCFAs, sendo que os mais produzidos são o acetato, o butirato e o propionato. O acetato é produzido por microrganismos como *Ruminococcus sp.*, *Prevotella sp.* e *Bifidobacterium sp.* A fermentação do amido é a principal via de produção de butirato, sendo feita por microrganismos como *Eubacterium rectale*, *Eubacterium halli*, *Ruminococcus bromii*, entre outros. O propionato pode ser obtido por *Bacteroides sp.* Em geral, acredita-se que o acetato seja o ácido gordo de cadeia curta mais prevalente, seguido pelo propionato e depois pelo butirato. (Lippi et al., 2017)

Estes SCFAs podem desempenhar um papel essencial na regulação da inflamação e resultarem efeitos protetores ou causadores, estimulando ou atenuando a produção de citocinas inflamatórias, que em excesso vão atrair mais células imunes, formando um círculo vicioso que leva à formação de células espumosas e ao desenvolvimento de aterosclerose. (Ma and Li, 2018;Warrier et al., 2015)

Acredita-se que os SCFAs tenham efeitos anti-inflamatórios, no entanto sabe-se que alterações nas concentrações destes ácidos gordos podem causar desequilíbrios imunológicos e metabólicos no organismo e diversas pesquisas já demonstraram a ligação entre os SCFAs e os fatores de risco para as doenças cardiovasculares, como hipertensão, diabetes, obesidade, entre outros. Assim, são ainda necessários mais estudos para se poder continuar a avançar na descodificação total do microbioma humano e as suas implicações, sabendo-se já que é necessário estimar as concentrações apropriadas de SCFAs para manter a homeostasia do organismo. (Yamashita et al., 2016;Zeisel and Warrier, 2017)

Parece agora claro que estas estirpes bacterianas contribuem ativamente para aumentar a concentração endógena de TMAO e de SCAFs e, conseqüentemente, aumentar o risco de isquemia e acidentes trombóticos. Com isto, abrem-se portas para uma eficaz prevenção cardiovascular, tendo como alvo o microbioma intestinal.

A disbiose tem sido implicada no desenvolvimento de doenças cardiovasculares através de vias independentes do metabolismo e dependentes do metabolismo., promovendo dois importantes fatores de risco: a aterosclerose e a hipertensão.

3.1. Hipertensão

A hipertensão arterial é um dos problemas de saúde pública mais graves a nível global, contribuindo gravemente para situações patológicas como enfartes, doenças coronárias, falência renal, morte prematura, entre outras, sendo considerada o fator de risco para doenças cardiovasculares mais prevalentes. Os fatores ambientais, como consumo de sal na dieta, consumo de álcool e falta de exercício físico, também estão relacionados com o aumento da pressão arterial. Alguns estudos recentes indicam que o microbioma humano está também envolvido na regulação da pressão arterial.

Em adição à aterosclerose, a disbiose pode também contribuir para a progressão da hipertensão, podendo esta ser definida como uma diminuição no lúmen arterial que vai aumentar a resistência vascular periférica, resultando em hipertensão arterial (HA).

Geralmente a regulação da pressão arterial tem sido relacionada com o sistema renina-angiotensina, que envolve a enzima conversora da angiotensina (ECA), e embora a ligação direta entre a hipertensão e o TMAO não tenha sido estabelecida atualmente, foi já observado o papel do TMAO que prolonga o efeito hipertensivo da angiotensina II. A inibição da produção de TMAO, através da modulação do microbioma intestinal, pode servir como uma boa abordagem terapêutica para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares. (Zheng *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2017)

Por conseguinte, estudos já vieram provar que algumas enzimas presentes em probióticos são também capazes de, durante a fermentação, libertarem péptidos inibidores da ECA, e assim levar a uma diminuição da pressão arterial.

Recentemente, vários estudos em animais e humanos analisaram a relação entre o microbioma humano e a pressão arterial, onde ficou demonstrada uma grande diminuição na variedade e diversidade microbiana presente em eventos hipertensivos. De facto, microrganismos do filo Bacteroidetes estão bastante reduzidas, enquanto microrganismos do filo Firmicutes aumentaram proporcionalmente.(Al Khodor *et al.*, 2017)

Os ácidos gordos de cadeia curta são outro sinal importante gerado pelo microbioma intestinal, e nos últimos tempos foi demonstrado que estes podem modular a pressão arterial. Os SCFAs são um importante produto da fermentação microbiana no intestino e têm amplos impactos na fisiologia do hospedeiro, nomeadamente na suscetibilidade a doenças. Estes podem estimular a via da proteína G acoplada ao recetor, que vai ter impacto na secreção de renina e por sua vez na regulação da pressão arterial. (Kitai and Tang, 2017;Tang *et al.*, 2017)

Assim, o microbioma humano está interligado funcionalmente com a pressão arterial, e uma disbiose no mesmo estará sempre associada a um evento de hipertensão.

3.2. Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crónica, caracterizada pela formação de placas nas artérias, com acumulação de lípidos e células, como leucócitos, células endoteliais e células espumosas nas membranas, e regiões calcificadas. Nesta, tanto a imunidade inata quanto a adquirida estão envolvidas e a inflamação das paredes dos vasos é uma característica importante da aterosclerose, contribuindo para a instabilidade das placas e para a oclusão trombótica das artérias, resultando em eventos cardiovasculares, como acidentes vasculares cerebrais, e síndromes coronárias agudas.

Quase todas as doenças cardiovasculares são provocadas por aterosclerose, ou seja, pelo depósito de placas de gordura e cálcio no interior das artérias que dificultam a

circulação sanguínea nos órgãos e podem mesmo chegar a impedi-la. Quando a aterosclerose aparece nas artérias coronárias, pode causar sintomas e doenças como a angina de peito, ou provocar um enfarte do miocárdio. Quando se desenvolve nas artérias do cérebro, pode originar sintomas como, por exemplo, alterações de memória, tonturas ou causar um acidente vascular cerebral (AVC). (Jie *et al.*, 2017)

Sabe-se que a aterosclerose se desenvolve por duas vias relacionadas com a disbiose: independentes do metabolismo e dependentes do metabolito. Na via independente do metabolismo, alguns componentes bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS) encontrados na membrana externa das bactérias de Gram negativo podem promover a formação de células espumosas. Estas células espumosas são macrófagos, que fagocitaram grandes quantidades de colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na tentativa de removê-las da corrente sanguínea. As células espumosas ao depositarem na placa arterial, contribuem ainda mais para a aterosclerose. (Manco *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2017)

A disbiose do microbioma humano pode promover a formação destas células, induzida por uma endotoxemia metabólica, que é uma condição caracterizada pelo aumento de LPS na circulação sanguínea. Quando esta disbiose é induzida por uma dieta rica em gorduras, vai haver uma redução do número de *Bifidobacterium*, que têm como função servir de barreira intestinal, e prevenir a translocação bacteriana.

Além da via independente do metabolismo, a disbiose pode levar a efeitos pro-ateroscleróticos, alterando a formação de uma grande variedade de metabolitos, nomeadamente pode afetar o metabolismo de ácidos biliares, a produção de N-óxido de trimetilamina e de butirato. (Senthong *et al.*, 2016)

Na figura seguinte podemos ver a ligação entre a disbiose e a aterosclerose e a hipertensão, que são preditivos de doenças cardiovasculares.

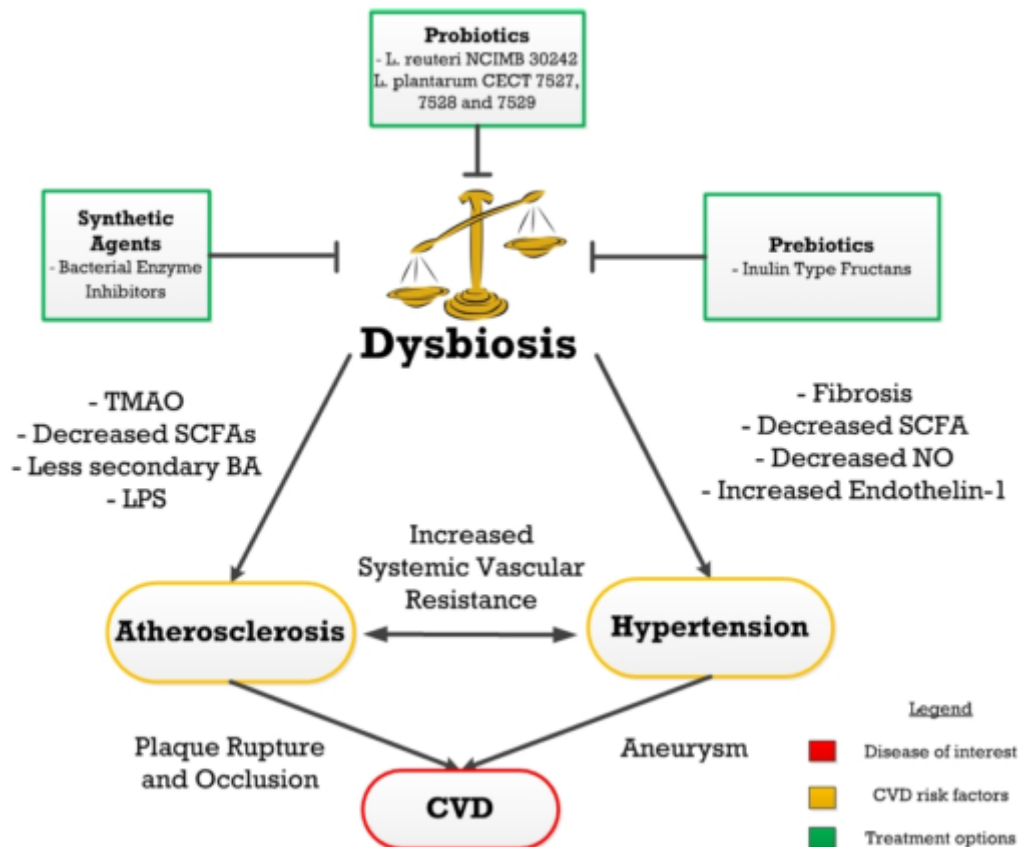


Figura 8 – Visão geral da ligação entre a disbiose, fatores de risco e as doenças cardiovasculares, e possíveis tratamentos, como os probióticos e prebióticos. (retirado de (Lau *et al.*, 2017))

Como já dito anteriormente, a disbiose tem sido implicada no aparecimento das doenças cardiovasculares, principalmente através dos dois fatores de risco: a aterosclerose, devido ao N-óxido de trimetilamina, à diminuição de SCFAs, aos ácidos biliares e aos lipopolissacarídeos, e a hipertensão, devido à diminuição de SCFAs, à fibrose vascular e à alteração do tônus vascular. Como as DCV são a causa número um de morte a nível mundial, é necessário continuar a investigar o microbioma humano como sendo um promissor alvo terapêutico para pesquisas futuras, seja através de probióticos, prebióticos ou enzimas inibidoras. (Lau *et al.*, 2017)

3.3. Relação da periodontite com a aterosclerose

A periodontite é induzida em hospedeiros suscetíveis por uma comunidade microbiana, na qual diferentes microrganismos desempenham papéis distintos que convergem sinergicamente para causar uma inflamação destrutiva. Na figura 9 podemos observar todo esse processo inflamatório.

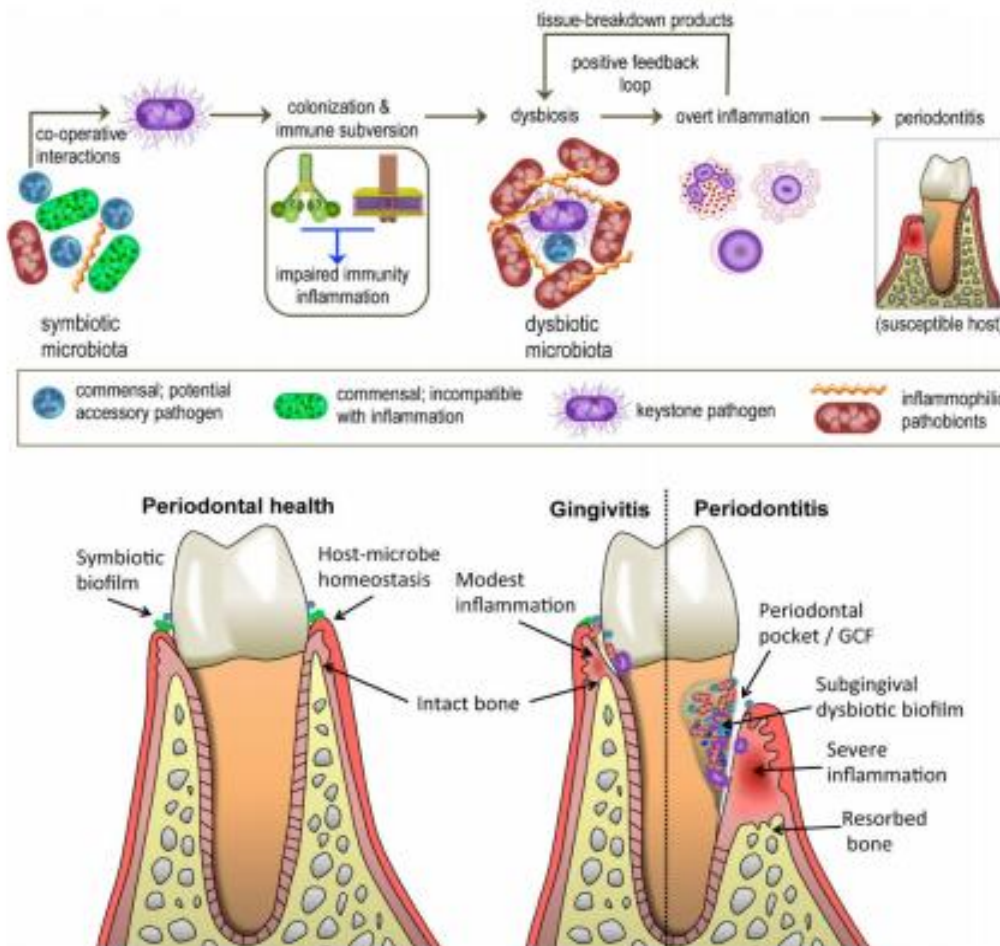


Figura 9 – Efeito sinérgico dos microrganismos na disbiose da periodontite (retirado de (Hajishengallis, 2015))

A espécie *Porphyromonas gingivalis* é conhecida por ser um agente patogênico fundamental que tem o potencial de distorcer o equilíbrio, sendo depois a sua ação facilitada por outros agentes patogênicos acessórios, levando a uma condição de disbiose onde a resposta inflamatória vai destruir o tecido periodontal, incluindo a reabsorção do osso alveolar de suporte. Estas duas situações de inflamação e de disbiose vão reforçar-se uma na outra, uma vez que os produtos inflamatórios decorrentes da destruição de

tecidos que sustentam os dentes vão servir de nutrientes para o microbioma residente. Assim, as úlceras gengivais permitem que os microrganismos migrem para a circulação sistêmica e vão depois induzir um estímulo aterogênico. (Hajishengallis, 2015)

Na parte inferior da imagem podemos ver a progressão de um estado periodontal saudável para uma gengivite, onde se vê uma pequena inflamação mas sem perda óssea, e depois para uma periodontite, onde se podem observar úlceras gengivais e perda óssea.

Inúmeros estudos científicos sugerem que a periodontite está associada às doenças cardiovasculares, nomeadamente à aterosclerose, independentemente de fatores de risco como obesidade e tabagismo. Além disso, estudos clínicos indicam que o tratamento da periodontite reduz a inflamação sistêmica, e tem efeitos favoráveis sobre a aterosclerose, melhorando a função endotelial. (Friedewald *et al.*, 2009)

Pelo menos dois mecanismos biologicamente plausíveis podem explicar uma ligação causal entre a periodontite e a aterosclerose, conforme se pode observar pela figura 10.

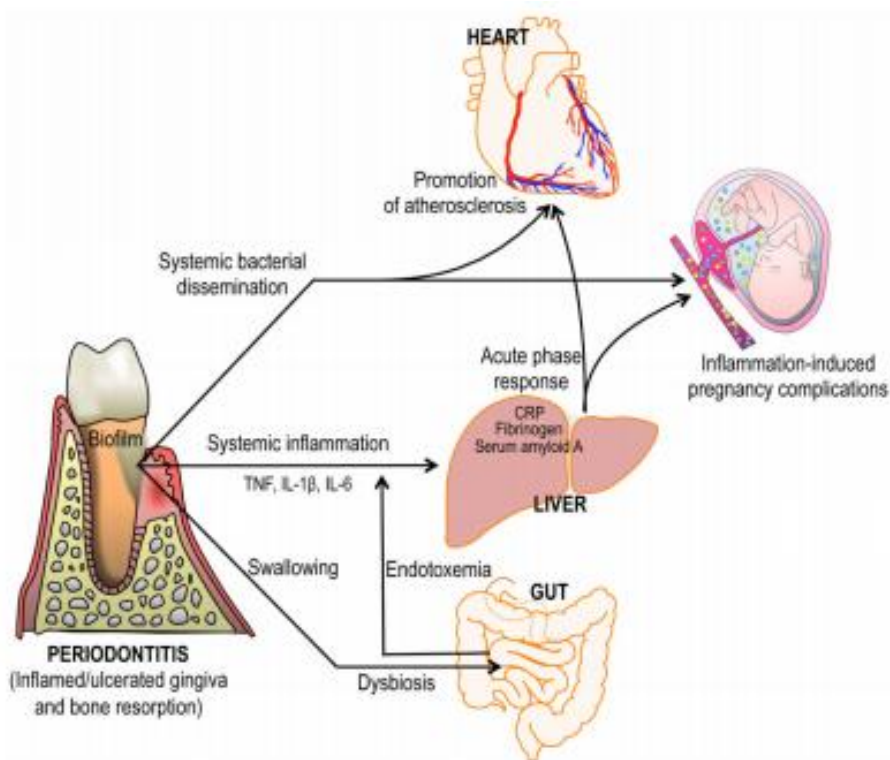


Figura 10 – Mecanismos biologicamente plausíveis que relacionam a periodontite com certas doenças. (retirado de (Hajishengallis, 2015))

Na periodontite, as citocinas pró-inflamatórias produzidas localmente, podem entrar na circulação sanguínea e induzir uma resposta de fase aguda no fígado, que vai ser caracterizada pelo aumento dos níveis de proteína C reativa, fibrinogênio e sérum amiloide A, que por sua vez contribuem para a aterosclerose ou para a exacerbação da inflamação hepática. (Friedewald et al., 2009;Hajishengallis, 2015)

Além disso, as úlceras formadas nas gengivas possibilitam a saída e disseminação de bactérias periodontais para todo o organismo, tanto que certas bactérias como *Porphyromonas gingivalis* foram detetadas em leucócitos circulantes e em lesões ateroscleróticas, onde vão poder atuar como estimulantes pro-aterogênicos. Outras bactérias periodontais como *Fusobacterium nucleatum* foram detetadas na placenta, onde podem causar reações nefastas durante a gravidez. (Hajishengallis, 2015)

Grandes quantidades de bactérias orais são constantemente ingeridas diariamente através da saliva, e vão até zonas mais profundas do organismo como o intestino. Quando ingerida *Porphyromonas gingivalis* vai provocar alterações no microbioma intestinal, levando ao aumento da permeabilidade do epitélio intestinal e causando uma inflamação sistêmica. (Hajishengallis, 2015)

4. Terapias Medicamentosas e Não Medicamentosas

A relação entre a saúde e o microbioma humano é muito abrangente. Devido à plasticidade inerente do microbioma, pode pensar-se em explorá-la para desenvolver novas terapias medicamentosas e não medicamentosas.

A manipulação do microbioma do hospedeiro tem demonstrado inúmeras aplicações promissoras em vários campos da ciência e da medicina. Além das estratégias terapêuticas já usadas, a modulação do microbioma humano através do uso de probióticos e prebióticos, da dieta mediterrânea e do transplante bacteriano fecal, têm vindo a ser consideradas uma opção em relação à antibioterapia para potenciar as funções benéficas nos tratamentos de disbioses, e especialmente para formular a suscetibilidade individual para a aterosclerose. (Grice, 2015)

4.1. Probióticos

Os probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro. Estes são notavelmente conhecidos pelos seus benefícios a nível de saúde humana, e têm vindo a ganhar um aumento de popularidade relativamente ao seu uso a nível do trato gastrointestinal. (Grice, 2015)

Os probióticos têm vindo a mostrar um efeito sobre doenças intestinais irritáveis, síndromes metabólicas, doenças cardiovasculares, enterocolites, defesa contra agentes patogénicos e infeções urogenitais. Os seus mecanismos de ação incluem a remodelação de comunidades microbianas e a supressão de agentes patogénicos, supressão de agentes pro-inflamatórios, efeitos na diferenciação de células epiteliais e proliferação e promoção da barreira intestinal. Mas além disto, vários estudos indicam que os probióticos podem também reduzir a intolerância à lactose, ter uma influência positiva no microbioma intestinal do hospedeiro, reduzir reações inflamatórias ou alérgicas, reduzir os níveis de colesterol no sangue, reduzir as manifestações de dermatite atópica, entre muitas outras funções. (Prakash et al., 2011; Wang and Ganly, 2014)

Os probióticos mais comuns são do género *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, residentes naturais do intestino humano e nos quais se verifica uma grande atividade da enzima hidrolase de sais biliares (BSH). Esta enzima, para além de contribuir para alterar a composição do microbioma intestinal, também vai atuar no metabolismo biliar, na desintoxicação e na diminuição dos níveis de colesterol. A desconjugação de sais biliares faz com que eles não sejam tão bem reabsorvidos como os conjugados, o que leva a uma maior excreção de ácidos biliares livres, diminuindo a solubilização e a absorção de lípidos pelo intestino, e assim reduzem-se os níveis séricos de colesterol no sangue. (Langdon et al., 2016; Lau et al., 2017)

O elevado nível de colesterol no sangue é considerado um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e embora exista uma terapêutica farmacológica disponível e eficaz para o tratamento desta condição, esta terapêutica acarreta alguns efeitos adversos indesejados e torna-se dispendiosa quando usada por doentes crónicos. Para tal, a administração oral destes probióticos mostrou reduzir significativamente os níveis de colesterol, sem metade dos efeitos adversos da terapêutica convencional, muito devido à atividade da BSH. (O'Flaherty *et al.*, 2018)

Recentemente, tem-se falado muito de microencapsulação de probióticos. Esta fornece aos microrganismos vivos uma barreira de proteção física, que é usada principalmente para melhorar a atividade probiótica durante o trânsito gastrointestinal, enquanto permite a difusão de metabolitos e substratos do meio interno para o meio externo da microcápsula. Por outro lado, esta técnica oferece também um sistema de entrega microbiana direcionado para o alvo terapêutico, e ainda garante a imunomodulação impedindo a interação entre o sistema imune do hospedeiro e os microrganismos probióticos encapsulados. No entanto, esta técnica ainda apresenta algumas limitações, pois para garantir o sucesso da técnica é necessário manter-se a viabilidade das células probióticas em locais onde haja um pH baixo e elevadas concentrações de sais biliares. (Fiocchi et al., 2012)

Assim, os probióticos apresentam-se como uma nova terapia para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, interferindo na formação, progressão e eventual rutura de placas ateroscleróticas.

4.2. Prebióticos

Entre os diferentes fatores ambientais que afetam o microbioma humano, a dieta é um dos mais importantes. Os prebióticos são ingredientes alimentares constituintes da dieta, não digeríveis, que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um ou de um número limitado de bactérias e, assim, melhorar a saúde deste. De facto, os prebióticos podem estimular efeitos atero-protetores, e reduzir o risco de doenças cardiovasculares, promovendo o crescimento do microbioma intestinal benéfico. (Grice, 2015;Prakash et al., 2011;Catry *et al.*, 2017)

Um prebiótico não deve ser hidrolisado por enzimas intestinais humanas, mas sim fermentado seletivamente por bactérias, beneficiando o hospedeiro, e os efeitos da sua administração incluem: níveis reduzidos de triglicerídeos, melhoria dos níveis de glicose pós-prandial e redução da permeabilidade intestinal e da inflamação. Além destes, estão também a ser desenvolvidos alimentos e fármacos para aumentar o crescimento de populações de células microbianas promotoras de saúde no trato gastrointestinal, com o objetivo de prevenir ou tratar várias doenças. Os polifenóis vegetais, encontrados em frutas e vegetais, mostraram ter propriedades prebióticas, viajando pelo intestino sem serem modificados e têm sido capazes de assim influenciar a composição do microbioma. (Langdon et al., 2016;Prakash et al., 2011)

Os efeitos prebióticos das maçãs têm vindo a ganhar um particular interesse na comunidade científica, devido ao seu consumo muito frequente pela sociedade. A modificação do microbioma associada ao consumo de maçãs, devido aos seus componentes juntamente com o efeito direto dos polifenóis, pode ter efeitos cardioprotetores como a redução de quadros de inflamação e dos níveis de colesterol total. (Femia *et al.*, 2012;Koutsos *et al.*, 2015)

A inulina e outros fruto-oligossacarídeos, por possuírem propriedades prebióticas já bem estabelecidas na literatura, são os prebióticos mais usados nos dias de hoje, sendo capazes de promover o crescimento de *Bifidobacterium*, que podem estar incorporadas em diversos alimentos. Como as enzimas pancreáticas do hospedeiro não conseguem hidrolisar as ligações β - 2,1 glicosídicas, esses polissacarídeos exógenos vão ser capazes de atravessar o intestino delgado, podendo ser usados pelos microrganismos do

microbioma intestinal e assim estimular o crescimento de bifidobactérias. (Le Barz *et al.*, 2015; Vyas and Ranganathan, 2012)

O crescimento de bifidobactérias pode ajudar a manter a integridade da barreira intestinal, pois estas não degradam as glicoproteínas do muco intestinal. No entanto, numa situação de disbiose, devido a um desequilíbrio dos níveis destas bactérias, pode haver o aumento da translocação bacteriana e da endotoxemia metabólica através do aumento da permeabilidade intestinal, pois os níveis de lipopolissacarídeos vão estar aumentados. Assim, tratamentos com prebióticos como suplementos dietéticos de frutanos aumentam as populações de bifidobactérias e tal pode reduzir a translocação de LPS para a circulação sanguínea, prevenindo efeitos ateroscleróticos. (Catry *et al.*, 2017)

Na tabela 2 apresenta-se um resumo dos efeitos dos probióticos e prebióticos para o tratamento de doenças cardiovasculares, visando a composição do microbioma humano.

Tabela 2 – Exemplos de potenciais tratamentos para as doenças cardiovasculares (adaptado de Lau K, Srivatsav V, 2017)

Tratamento	Prebióticos	Probióticos
Definição	Constituintes dietéticos que promovem a composição saudável do microbioma intestinal	Microrganismos vivos que desenvolvem ou restauram a composição do microbioma intestinal
Exemplos	- Alimentos ricos em inulina e oligofrutose - Polifenóis vegetais - Frutas e vegetais	- <i>Lactobacillus reuteri</i> - <i>Lactobacillus plantarum</i>

4.3. Intervenção na dieta

Os alimentos e os constituintes da dieta contribuem para a estrutura da comunidade microbiana do corpo humano e para a atividade funcional dos mesmos. Dado que os componentes da dieta servem como fontes de energia e nutrientes para o crescimento microbiano, os substratos que atingem o intestino grosso são um fator chave para a composição da comunidade microbiana. (Borgo *et al.*, 2017;Kim *et al.*, 2017)

Estudos epidemiológicos recentes indicam que uma dieta semelhante à mediterrânea, rica em fibras, está associada a um declínio significativo da pressão arterial e das doenças cardiovasculares. Estes efeitos benéficos podem ser devido ao aumento da ingestão de frutas, de legumes, de nozes, de peixe, de frango e de azeite, todos alimentos com um baixo índice glicêmico, tendo também pouca quantidade de carne vermelha. A maioria destes alimentos possui um elevado teor de flavonoides, carotenoides, ácidos gordos de ômega-3, antioxidantes, vitaminas e minerais, bem como aminoácidos essenciais e não essenciais. (Guasch-Ferre *et al.*, 2017;Singh *et al.*, 2017)

As dietas ricas em fibras e vegetais, tal como a dieta mediterrânea, têm como consequência um aumento de bactérias do filo Bacteroidetes e Actinobacteria, e uma diminuição do filo Firmicutes, contrariamente ao que acontece noutras dietas ricas em lípidos. Descobriu-se assim que o elevado consumo de fibras modifica as populações do microbioma intestinal, aumentando a abundância de bactérias produtoras de acetato, e tanto as fibras como o acetato vão diminuir as condições de disbiose que possam ser encontradas no organismo, medida pela razão entre Firmicutes e Bacteroidetes. (Singh *et al.*, 2017;Nelson *et al.*, 2015)

Assim, pode-se dizer que uma dieta rica em fibras leva a alterações no microbioma intestinal, desempenhando um papel protetor na progressão de doenças cardiovasculares. Os efeitos favoráveis das fibras podem ser explicados pela criação e distribuição de um dos principais metabolitos do microbioma intestinal, o acetato (ácido gordo de cadeia curta). Este vai efetuar várias alterações moleculares associadas à melhoria da saúde e da função cardiovascular, quando nas concentrações adequadas. (Nelson *et al.*, 2015;Marques *et al.*, 2017)

Também o consumo adequado de polifenóis, ácidos gordos monoinsaturados, e vitaminas reduz o risco de desenvolvimento de certas doenças, pelo seu efeito antioxidante que ao protegerem as células contra os danos provocados por espécies reativas de oxigénio, diminuem os níveis de LDL, triglicéridos e pressão arterial. Um outro estudo mostrou que também a ingestão aumentada de fibras na dieta e a suplementação com acetato, poderia modelar as vias renal e cardíaca para produzir efeitos benéficos cardiovasculares, e reduzir também a pressão arterial. (Marques et al., 2017; Del Chierico *et al.*, 2014)

4.4. Transplante Bacteriano Fecal

O transplante bacteriano fecal (FMT), também denominado bacterioterapia fecal, consiste num tipo de tratamento que implica a substituição ou reposição de microrganismos pertencentes à flora bacteriana de um indivíduo saudável para um indivíduo que tenha alguma patologia do foro intestinal e que por isso tenha o seu microbioma alterado, com o objetivo de restabelecer o equilíbrio microbiano no intestino. (Clemente *et al.*, 2012; Walker and Lawley, 2013)

Para infeções oportunistas resistentes a antibióticos, como as infeções por *Clostridium difficile*, as terapias alternativas aos antibióticos são muito superiores quando comparadas às abordagens apenas com esses fármacos. A transferência de microrganismos fecais de uma pessoa saudável para um indivíduo debilitado tem sido usada como uma alternativa em casos de diarreia recorrente e esta abordagem é a forma mais presente da terapia probiótica, já que toda a comunidade microbiana, que se encontra em equilíbrio, é administrada de uma vez só, sem ser necessário saber quais os componentes necessários à patologia. (Khoruts *et al.*, 2010; Stripling *et al.*, 2015)

Acredita-se que os microrganismos fecais saudáveis suprimam *C. difficile*, através da competição do seu nicho e da produção de inibidores de crescimento ainda não identificados. Num futuro próximo, estes transplantes podem tornar-se uma ferramenta crítica para limitar a disseminação de resistências aos antibióticos e poderá ser usada

noutras doenças associadas a disbiose intestinal, como na obesidade e na síndrome do cólon irritável. (Stripling et al., 2015)

5. Perspetivas Futuras

O microbioma humano é uma área de pesquisa com um enorme potencial para a exploração científica pura, com aplicações bio-terapêuticas muito significativas. Este continua amplamente inexplorado, devido à sua complexidade e às dificuldades na colheita de amostras e na análise de dados. É necessário otimizar os métodos para modular e caracterizar o microbioma.

Cada vez mais se sabe que quando há uma alteração ao nível do microbioma humano, estão associadas várias doenças metabólicas desde diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) a doenças cardiovasculares. Para avançar na terapêutica é essencial entender melhor se o microbioma humano está ligado causalmente ao metabolismo do hospedeiro em humanos.

Sabe-se que a ingestão de alimentos como frutas e legumes está associada a uma menor incidência de hipertensão, mas os mecanismos envolvidos ainda não estão bem elucidados, pelo que é necessário realizarem-se mais estudos para tal.

Num futuro próximo e com os grandes avanços da tecnologia, é fácil prever que os probióticos microencapsulados possam em breve estar disponíveis no mercado, mais aptos do que antes e que a pesquisa possa concentrar-se no desenvolvimento de formulações que combinem probióticos micro-encapsulados com prebióticos e/ou antibióticos. O principal desafio será desenvolver modelos adequados para caracterizar e entender o microbioma, e desenvolver formulações de tratamento eficazes como o direcionamento de probióticos diretamente no alvo terapêutico, dentro do trato gastrointestinal. (Prakash et al., 2011)

São também necessárias intervenções dietéticas controladas que documentem a utilidade de vários suplementos, probióticos, nutrientes e alimentos na modulação do microbioma. Estas poderão fornecer informações que podem abrir caminho para uma nutrição precisa e focada no microbioma de cada região do corpo humano, em específico.

Além disto, a falta de compreensão do papel das células microbianas na saúde humana e a falta de ensaios clínicos bem definidos, como sistemas de libertação de probióticos, estão a dificultar muito o avanço nesta área científica tão promissora.

O desenvolvimento de tecnologias avançadas para o total entendimento do microbioma humano, para a sua manipulação e para o desenvolvimento de novas formulações para administração de probióticos, como a microencapsulação, estão a gerar uma enorme riqueza de conhecimentos sobre a saúde e a doença humana, e estes são fortemente necessários para a descobertas de novas terapias. (Prakash et al., 2011)

6. Conclusão

O microbioma humano define-se como uma comunidade de microrganismos presente em várias regiões do organismo humano juntamente com os seus genes, e assume um papel fundamental na vida do ser humano, desde o nascimento até ao fim da sua vida, estando intimamente relacionado com a alimentação e com o estilo de vida que adotamos.

Recentemente descobriu-se que o microbioma tem uma enorme relevância na saúde passando a considerar-se como um alvo terapêutico muito importante. A sua caracterização em locais como o trato gastrointestinal, a pele e o trato urogenital é essencial para se fazer uma conexão com os estados patológicos. No entanto, o microbioma continua amplamente inexplorado devido à sua complexidade e às dificuldades na colheita e análise de dados.

O equilíbrio entre as espécies microbianas presentes no organismo humano é fundamental para manter a homeostasia do organismo, sendo extremamente importante para a saúde humana. Quando há uma alteração nesta homeostasia vão ficar implicadas situações patológicas como obesidade, doenças gastrointestinais, doenças inflamatórias, doenças cardiovasculares, entre outras.

O microbioma intestinal tem um papel essencial no metabolismo de muitos componentes alimentares, tais como colina, fosfatidilcolina e carnitina, levando à formação de compostos potencialmente pro-ateroscleróticos, como o N-óxido de trimetilamina, o que vai provocar situações de disbiose com consequências potencialmente severas. O processo trimetilamina/N-óxido de trimetilamina representa uma das muitas vias dependentes de microrganismos que está ligada às doenças cardiovasculares, e que já se provou ser um alvo terapêutico a ter em consideração. É importante notar que esses estudos também nos ajudam a entender melhor como a nutrição está vinculada à saúde do hospedeiro e à suscetibilidade para doenças.

Uma vez reveladas novas estratégias diagnósticas, terapêuticas e preventivas que alavanquem a sua identificação, podem se tornar parte do arsenal para deter e reverter doenças cardiovasculares.

Em comparação com a compreensão do genoma humano, a pesquisa do microbioma tem um enorme potencial em intervenções no diagnóstico e na terapêutica, pois defeitos genéticos humanos podem ser usados no diagnóstico de distúrbios, no entanto serão difíceis de corrigir. Por outro lado, o microbioma humano é caracterizado pela sua plasticidade, o que leva a que seja possível a sua modulação de forma benéfica, melhorando a saúde humana e sendo possível prevenir e reduzir o desenvolvimento de variadas doenças, como as cardiovasculares.

Desta forma, a modulação do microbioma através do uso de probióticos, de prebióticos, de intervenções na dieta e do transplante bacteriano fecal é capaz de prevenir o aparecimento e a progressão de determinadas patologias, no entanto apesar de todos estes avanços, ainda muito está para descobrir. Espera-se, assim, que futuras investigações possam trazer novas terapêuticas que resultem numa melhoria da qualidade de vida do ser humano.

7. Referências

- Al Khodor, S.; Reichert, B. and Shatat, I. F. (2017). The Microbiome and Blood Pressure: Can Microbes Regulate Our Blood Pressure? *Front Pediatr*, 5, pp.138.
- Arora, T. and Sharma, R. (2011). Fermentation potential of the gut microbiome: implications for energy homeostasis and weight management. *Nutr Rev*, 69, pp.99-106.
- Avila, M.; Ojcius, D. M. and Yilmaz, O. (2009). The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*, 28, pp.405-11.
- Bain, M. A.; Fornasini, G. and Evans, A. M. (2005). Trimethylamine: metabolic, pharmacokinetic and safety aspects. *Curr Drug Metab*, 6, pp.227-40.
- Barko, P. C.; McMichael, M. A.; Swanson, K. S., *et al.* (2017). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med*.
- Bennett, D. C.; Tun, H. M.; Kim, J. E., *et al.* (2013). Characterization of cecal microbiota of the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet Microbiol*, 166, pp.304-10.
- Borgo, F.; Verduci, E.; Riva, A., *et al.* (2017). Relative Abundance in Bacterial and Fungal Gut Microbes in Obese Children: A Case Control Study. *Child Obes*, 13, pp.78-84.
- Brown, J. M. and Hazen, S. L. (2018). Microbial modulation of cardiovascular disease. *Nat Rev Microbiol*, 16, pp.171-181.
- Bryan, N. S.; Tribble, G. and Angelov, N. (2017). Oral Microbiome and Nitric Oxide: the Missing Link in the Management of Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep*, 19, pp.33.
- Capone, K. A.; Dowd, S. E.; Stamatas, G. N., *et al.* (2011). Diversity of the human skin microbiome early in life. *J Invest Dermatol*, 131, pp.2026-32.
- Catry, E.; Bindels, L. B.; Tailleux, A., *et al.* (2017). Targeting the gut microbiota with inulin-type fructans: preclinical demonstration of a novel approach in the management of endothelial dysfunction. *Gut*.
- Chen, T.; Yu, W. H.; Izard, J., *et al.* (2010). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)*, 2010, pp.baq013.
- Cho, C. E. and Caudill, M. A. (2017). Trimethylamine-N-Oxide: Friend, Foe, or Simply Caught in the Cross-Fire? *Trends Endocrinol Metab*, 28, pp.121-130.
- Chong-Nguyen, C.; Duboc, H. and Sokol, H. (2017). [The gut microbiota, a new cardiovascular risk factor?]. *Presse Med*, 46, pp.708-713.

- Chung, H. and Kasper, D. L. (2010). Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr Opin Immunol*, 22, pp.455-60.
- Claesson, M. J.; Jeffery, I. B.; Conde, S., *et al.* (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488, pp.178-84.
- Clemente, J. C.; Ursell, L. K.; Parfrey, L. W., *et al.* (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148, pp.1258-70.
- Costello, E. K.; Lauber, C. L.; Hamady, M., *et al.* (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, pp.1694-7.
- David, L. A.; Maurice, C. F.; Carmody, R. N., *et al.* (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505, pp.559-63.
- Del Chierico, F.; Vernocchi, P.; Dallapiccola, B., *et al.* (2014). Mediterranean diet and health: food effects on gut microbiota and disease control. *Int J Mol Sci*, 15, pp.11678-99.
- Dewhirst, F. E.; Chen, T.; Izard, J., *et al.* (2010). The human oral microbiome. *J Bacteriol*, 192, pp.5002-17.
- Dominguez-Bello, M. G.; Blaser, M. J.; Ley, R. E., *et al.* (2011). Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology*, 140, pp.1713-9.
- Femia, A. P.; Salvianti, F.; Luceri, C., *et al.* (2012). Sustained proliferation and resistance to apoptosis after a cytotoxic insult are early alterations in rat colon carcinogenesis. *Int J Cancer*, 131, pp.529-36.
- Fiocchi, A.; Burks, W.; Bahna, S. L., *et al.* (2012). Clinical Use of Probiotics in Pediatric Allergy (CUPPA): A World Allergy Organization Position Paper. *World Allergy Organ J*, 5, pp.148-67.
- Flint, H. J.; Scott, K. P.; Louis, P., *et al.* (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9, pp.577-89.
- Ford, P. J.; Gemmell, E.; Timms, P., *et al.* (2007). Anti-P. gingivalis response correlates with atherosclerosis. *J Dent Res*, 86, pp.35-40.
- Friedewald, V. E.; Kornman, K. S.; Beck, J. D., *et al.* (2009). The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Periodontol*, 80, pp.1021-32.
- Gaci, N.; Borrel, G.; Tottey, W., *et al.* (2014). Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J Gastroenterol*, 20, pp.16062-78.
- Gao, Z.; Tseng, C. H.; Pei, Z., *et al.* (2007). Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, pp.2927-32.

- Gerritsen, J.; Smidt, H.; Rijkers, G. T., *et al.* (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr*, 6, pp.209-40.
- Giacomoni, P. U.; Mammone, T. and Teri, M. (2009). Gender-linked differences in human skin. *J Dermatol Sci*, 55, pp.144-9.
- Grice, E. A. (2015). The intersection of microbiome and host at the skin interface: genomic- and metagenomic-based insights. *Genome Res*, 25, pp.1514-20.
- Grice, E. A.; Kong, H. H.; Conlan, S., *et al.* (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324, pp.1190-2.
- Grice, E. A. and Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 9, pp.244-53.
- Griffin, J. L.; Wang, X. and Stanley, E. (2015). Does our gut microbiome predict cardiovascular risk? A review of the evidence from metabolomics. *Circ Cardiovasc Genet*, 8, pp.187-91.
- Griffiths, K.; Aggarwal, B. B.; Singh, R. B., *et al.* (2016). Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Diseases*, 4.
- Guasch-Ferre, M.; Hu, F. B.; Ruiz-Canela, M., *et al.* (2017). Plasma Metabolites From Choline Pathway and Risk of Cardiovascular Disease in the PREDIMED (Prevention With Mediterranean Diet) Study. *J Am Heart Assoc*, 6.
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15, pp.30-44.
- Hannigan, G. D. and Grice, E. A. (2013). Microbial ecology of the skin in the era of metagenomics and molecular microbiology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3, pp.a015362.
- Holland, K. T. and Bojar, R. A. (2002). Cosmetics: what is their influence on the skin microflora? *Am J Clin Dermatol*, 3, pp.445-9.
- Honda, K. and Littman, D. R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535, pp.75-84.
- Jenkinson, H. F. and Lamont, R. J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*, 13, pp.589-95.
- Jernberg, C.; Lofmark, S.; Edlund, C., *et al.* (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, 156, pp.3216-23.
- Jie, Z.; Xia, H.; Zhong, S. L., *et al.* (2017). The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Commun*, 8, pp.845.

- Jourdain, S.; Dreze, P. A.; Vandeven, J., *et al.* (2011a). Sequential multiplex PCR assay for determining capsular serotypes of colonizing *S. pneumoniae*. *BMC Infect Dis*, 11, pp.100.
- Jourdain, S.; Smeesters, P. R.; Denis, O., *et al.* (2011b). Differences in nasopharyngeal bacterial carriage in preschool children from different socio-economic origins. *Clin Microbiol Infect*, 17, pp.907-14.
- Karstens, L.; Asquith, M.; Davin, S., *et al.* (2016). Does the Urinary Microbiome Play a Role in Urgency Urinary Incontinence and Its Severity? *Front Cell Infect Microbiol*, 6, pp.78.
- Khanna, S. and Tosh, P. K. (2014). A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. *Mayo Clin Proc*, 89, pp.107-14.
- Khoruts, A.; Dicksved, J.; Jansson, J. K., *et al.* (2010). Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Gastroenterol*, 44, pp.354-60.
- Kim, Y.; Keogh, J. B. and Clifton, P. M. (2017). Benefits of Nut Consumption on Insulin Resistance and Cardiovascular Risk Factors: Multiple Potential Mechanisms of Actions. *Nutrients*, 9.
- Kitai, T. and Tang, W. H. W. (2017). The Role and Impact of Gut Microbiota in Cardiovascular Disease. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 70, pp.799-800.
- Koenig, J. E.; Spor, A.; Scalfone, N., *et al.* (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, pp.4578-85.
- Koeth, R. A.; Wang, Z.; Levison, B. S., *et al.* (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*, 19, pp.576-85.
- Koutsos, A.; Tuohy, K. M. and Lovegrove, J. A. (2015). Apples and cardiovascular health--is the gut microbiota a core consideration? *Nutrients*, 7, pp.3959-98.
- Langdon, A.; Crook, N. and Dantas, G. (2016). The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med*, 8, pp.39.
- Lau, K.; Srivatsav, V.; Rizwan, A., *et al.* (2017). Bridging the Gap between Gut Microbial Dysbiosis and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*, 9.
- Le Barz, M.; Anhe, F. F.; Varin, T. V., *et al.* (2015). Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J*, 39, pp.291-303.
- Ling, Z.; Kong, J.; Liu, F., *et al.* (2010). Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics*, 11, pp.488.

- Lippi, G.; Danese, E.; Mattiuzzi, C., *et al.* (2017). The Intriguing Link between the Intestinal Microbiota and Cardiovascular Disease. *Semin Thromb Hemost*, 43, pp.609-613.
- Ma, J. and Li, H. (2018). The Role of Gut Microbiota in Atherosclerosis and Hypertension. *Front Pharmacol*, 9, pp.1082.
- Mahdavinia, M.; Fox, S. R.; Smith, B. M., *et al.* (2017). Racial Differences in Food Allergy Phenotype and Health Care Utilization among US Children. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 5, pp.352-357 e1.
- Manco, M.; Putignani, L. and Bottazzo, G. F. (2010). Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocr Rev*, 31, pp.817-44.
- Mariat, D.; Firmesse, O.; Levenez, F., *et al.* (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*, 9, pp.123.
- Marques, F. Z.; Nelson, E.; Chu, P. Y., *et al.* (2017). High-Fiber Diet and Acetate Supplementation Change the Gut Microbiota and Prevent the Development of Hypertension and Heart Failure in Hypertensive Mice. *Circulation*, 135, pp.964-977.
- Morgan, X. C.; Segata, N. and Huttenhower, C. (2013). Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet*, 29, pp.51-8.
- Mozaffarian, D. (2016). Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity: A Comprehensive Review. *Circulation*, 133, pp.187-225.
- Nelson, M. H.; Diven, M. A.; Huff, L. W., *et al.* (2015). Harnessing the Microbiome to Enhance Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res*, 2015, pp.368736.
- O'Flaherty, S.; Briner Crawley, A.; Theriot, C. M., *et al.* (2018). The Lactobacillus Bile Salt Hydrolase Repertoire Reveals Niche-Specific Adaptation. *mSphere*, 3.
- Oh, J.; Conlan, S.; Polley, E. C., *et al.* (2012). Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Med*, 4, pp.77.
- Parfrey, L. W. and Knight, R. (2012). Spatial and temporal variability of the human microbiota. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 4, pp.8-11.
- Pearce, M. M.; Hilt, E. E.; Rosenfeld, A. B., *et al.* (2014). The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio*, 5, pp.e01283-14.
- Prakash, S.; Rodes, L.; Coussa-Charley, M., *et al.* (2011). Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, 5, pp.71-86.

- Qin, J.; Li, R.; Raes, J., *et al.* (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, pp.59-65.
- Ravel, J.; Gajer, P.; Abdo, Z., *et al.* (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, pp.4680-7.
- Rodriguez, J. M.; Murphy, K.; Stanton, C., *et al.* (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*, 26, pp.26050.
- Rosenthal, M.; Goldberg, D.; Aiello, A., *et al.* (2011). Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect Genet Evol*, 11, pp.839-48.
- Salonen, A. and de Vos, W. M. (2014). Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annu Rev Food Sci Technol*, 5, pp.239-62.
- Sartor, R. B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134, pp.577-94.
- Senthong, V.; Wang, Z.; Fan, Y., *et al.* (2016). Trimethylamine N-Oxide and Mortality Risk in Patients With Peripheral Artery Disease. *J Am Heart Assoc*, 5.
- Siddiqui, H.; Nederbragt, A. J.; Lagesen, K., *et al.* (2011). Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiol*, 11, pp.244.
- Siezen, R. J. and Kleerebezem, M. (2011). The human gut microbiome: are we our enterotypes? *Microb Biotechnol*, 4, pp.550-3.
- Singh, R. K.; Chang, H. W.; Yan, D., *et al.* (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*, 15, pp.73.
- Stripling, J.; Kumar, R.; Baddley, J. W., *et al.* (2015). Loss of Vancomycin-Resistant Enterococcus Fecal Dominance in an Organ Transplant Patient With Clostridium difficile Colitis After Fecal Microbiota Transplant. *Open Forum Infect Dis*, 2, pp.ofv078.
- Struzycka, I. (2014). The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol*, 63, pp.127-35.
- Tang, W. H. and Hazen, S. L. (2017a). The Gut Microbiome and Its Role in Cardiovascular Diseases. *Circulation*, 135, pp.1008-1010.
- Tang, W. H. and Hazen, S. L. (2017b). Microbiome, trimethylamine N-oxide, and cardiometabolic disease. *Transl Res*, 179, pp.108-115.
- Tang, W. H.; Kitai, T. and Hazen, S. L. (2017). Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res*, 120, pp.1183-1196.

- Tsukumo, D. M.; Carvalho, B. M.; Carvalho Filho, M. A., *et al.* (2015). Translational research into gut microbiota: new horizons on obesity treatment: updated 2014. *Arch Endocrinol Metab*, 59, pp.154-60.
- Ursell, L. K.; Clemente, J. C.; Rideout, J. R., *et al.* (2012a). The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J Allergy Clin Immunol*, 129, pp.1204-8.
- Ursell, L. K.; Metcalf, J. L.; Parfrey, L. W., *et al.* (2012b). Defining the human microbiome. *Nutr Rev*, 70 Suppl 1, pp.S38-44.
- Ursell, L. K.; Van Treuren, W.; Metcalf, J. L., *et al.* (2013). Replenishing our defensive microbes. *Bioessays*, 35, pp.810-7.
- Vyas, U. and Ranganathan, N. (2012). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract*, 2012, pp.872716.
- Walker, A. W. and Lawley, T. D. (2013). Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacol Res*, 69, pp.75-86.
- Walther-Antonio, M. R.; Jeraldo, P.; Berg Miller, M. E., *et al.* (2014). Pregnancy's stronghold on the vaginal microbiome. *PLoS One*, 9, pp.e98514.
- Wang, L. and Ganly, I. (2014). The oral microbiome and oral cancer. *Clin Lab Med*, 34, pp.711-9.
- Wang, Z.; Klipfell, E.; Bennett, B. J., *et al.* (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472, pp.57-63.
- Warrier, M.; Shih, D. M.; Burrows, A. C., *et al.* (2015). The TMAO-Generating Enzyme Flavin Monooxygenase 3 Is a Central Regulator of Cholesterol Balance. *Cell Rep*.
- Whiteside, S. A.; Razvi, H.; Dave, S., *et al.* (2015). The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat Rev Urol*, 12, pp.81-90.
- Wolvers, D.; Antoine, J. M.; Myllyluoma, E., *et al.* (2010). Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *J Nutr*, 140, pp.698S-712S.
- Xu, X.; He, J.; Xue, J., *et al.* (2015). Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol*, 17, pp.699-710.
- Yamashita, T.; Emoto, T.; Sasaki, N., *et al.* (2016). Gut Microbiota and Coronary Artery Disease. *Int Heart J*, 57, pp.663-671.
- Yan, Q.; Gu, Y.; Li, X., *et al.* (2017). Alterations of the Gut Microbiome in Hypertension. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, pp.381.
- Zeisel, S. H. and Warrier, M. (2017). Trimethylamine N-Oxide, the Microbiome, and Heart and Kidney Disease. *Annu Rev Nutr*, 37, pp.157-181.

Zheng, Y.; Li, Y.; Rimm, E. B., *et al.* (2016). Dietary phosphatidylcholine and risk of all-cause and cardiovascular-specific mortality among US women and men. *Am J Clin Nutr*, 104, pp.173-80.