

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



O microbioma e as doenças neurodegenerativas

Catarina Alexandra D' Abreu Calado

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro,
Categoria Professora Associada.

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



O microbioma e as doenças neurodegenerativas

Catarina Alexandra D' Abreu Calado

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado
à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro,
Categoria Professora Associada.

2021

Resumo

O termo doenças neurodegenerativas abrange várias doenças com fisiopatologias diferentes, mas que têm como ponto comum a degeneração progressiva e a morte de neurónios, que resulta em fenómenos de ataxia ou demência. Neste grupo de doenças incluem-se a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP), a esclerose múltipla (EM) e a esclerose lateral amiotrófica (ELA).

Na última década, o interesse pelo microbioma intestinal e a sua influência nos processos fisiológicos cresceu exponencialmente, verificando-se que a sua ação transcende o intestino e se estende a outros órgãos, nomeadamente o cérebro através do eixo microbioma-intestino-cérebro (EMIC).

O microbioma está envolvido não só em processos relacionados com a homeostase energética, o metabolismo, a atividade imunológica, a sinalização endócrina e a saúde do epitélio intestinal, mas também com o desenvolvimento neurológico e comportamental. Deste modo, devido ao envolvimento que o microbioma tem na saúde do hospedeiro, em situações de alterações no equilíbrio do microbioma podem ser desencadeados processos fisiopatológicos, nomeadamente *stress* oxidativo e neuroinflamação que podem resultar na degeneração e morte de neurónios. Por esta razão, o microbioma, em estado de disbiose, está cada vez mais implicado na modificação da suscetibilidade para a progressão de doenças neurodegenerativas.

Desencadearam-se vários estudos no sentido de avaliar e caracterizar o microbioma intestinal de indivíduos diagnosticados com as diferentes doenças neurodegenerativas, sendo que foram obtidos alguns resultados muito promissores, no entanto, alguns resultados foram contraditórios em virtude da complexidade e interindividualidade do microbioma.

É ainda necessária alguma cautela na interpretação dos dados obtidos até à data, no entanto, com os avanços tecnológicos e com a utilização de métodos de investigação mais robustos e reprodutíveis, é expectável que, no futuro, a modulação do microbioma seja frequentemente utilizada na profilaxia e terapêutica das diferentes doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Microbioma; Doenças neurodegenerativas; Eixo microbioma-intestino-cérebro; Disbiose; Neurodegeneração

Abstract

The term neurodegenerative diseases encompasses several diseases with different pathophysiologies, which have as common point the progressive degeneration and death of neurons, which results in the ataxia or dementia phenomena. This group of diseases includes Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), multiple sclerosis (MS) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

In the last decade, interest in the gut microbiome and its influence on physiological processes has grown exponentially, verifying that its action transcends the intestine and extends to other organs, namely the brain through the microbiome-gut-brain axis (MGBA).

The microbiome is involved not only in processes related to energy homeostasis, metabolism, immune activity, endocrine signaling and the health of the intestinal epithelium, but also with neurological and behavioral development. Thus, due to the microbiome's involvement in the host's health, in situations of changes in the microbiome's balance, pathophysiological processes can be triggered, namely oxidative stress and neuroinflammation that can result in the degeneration and death of neurons. For this reason, the microbiome, in dysbiosis states, is increasingly involved in modifying the susceptibility to the progression of neurodegenerative diseases.

Several studies were prompted in order to evaluate and characterize the intestinal microbiome of individuals diagnosed with different neurodegenerative diseases, and some very promising results were obtained, however, some results were contradictory due to the complexity and inter-individuality of the microbiome.

To date caution is still needed when it comes to the interpretation of the data obtained, however, with technological advances and the use of more robust and reproducible research methods, it is expected that, in the future, the modulation of the microbiome will be frequently used in prophylaxis and therapeutics of different neurodegenerative diseases.

Keywords: Microbiome; Neurodegenerative diseases; Microbiome-gut-brain axis; Dysbiosis; Neurodegeneration

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro por me dar a conhecer este tema que tanto gostei de explorar, pela sua orientação, partilha de conhecimentos e pelo exemplo de docente que é.

À equipa da Farmácia Simões por serem um exemplo de excelência no atendimento e cuidado farmacêutico, por toda a simpatia e compreensão demonstradas ao longo do meu percurso e por todos os ensinamentos, não só a nível profissional, mas também pessoal.

Aos meus amigos, Isabel, João Paulo, Mafalda Pereira, Mafalda Cruz, Nicole, Pedro, Patrícia e Sara, por terem sido os meus verdadeiros cúmplices nestes últimos 5 anos e por terem recheado a minha vida de amizade, alegria e, acima de tudo, de momentos que irei relembrar sempre com muito carinho.

Aos meus pais e à minha irmã, um agradecimento muito especial por serem a minha referência e pelo apoio e incentivo que me deram ao longo de toda a vida. Obrigada pelos valores transmitidos, pela paciência constante e pela confiança.

Um sincero Obrigada a todos vocês.

Abreviaturas

16s rRNA	Gene 16S do RNA ribossomal
5HT	Serotonina
α-sin	Alfa-sinucleína
βA	Beta-amiloide
ACh	Acetilcolina
BHE	Barreira hematoencefálica
CCK	Colecistocinina
CEE	Células enteroendócrinas
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
EM	Esclerose múltipla
EHHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
EMIC	Eixo microbioma-intestino-cérebro
FFAR	Recetores de ácidos gordos livres
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GALT	Tecido linfático associado ao intestino
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> (Fator neurotrófico derivado da célula glial)
GF	<i>Germ-free</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GOS	Galactooligossacáridos
IEC	<i>Intestinal epithelial cells</i> (Células epiteliais intestinais)
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacárido
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (Fator de crescimento de nervos)
NV	Nervo vago
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PYY	Péptido YY

- RNS** *Reactive nitrogen species* (Espécies reativas de azoto).
- ROS** *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigénio)
- SCFAs** *Short-chain fatty acids* (Ácidos gordos de cadeia curta)
- SNC** Sistema nervoso central
- SNE** Sistema nervoso entérico
- SNS** Sistema nervoso simpático
- TGI** Trato Gastrointestinal
- TLR** *Toll-like receptors* (Recetores Toll-like)
- TMF** Transplante de microbiota fecal
- Th** T *Helper*

Índice:

Resumo.....	III
Abstract	IV
Agradecimentos	V
Abreviaturas	VI
1. Introdução	10
2. Objetivos	11
3. Métodos	12
4. Microbiota e microbioma	13
4.1. Caracterização da microbiota intestinal	13
4.2. Fatores que influenciam a composição do microbioma	14
4.2.1. Primeira colonização	14
4.2.2. Idade	16
4.2.3. Alimentação	16
4.2.4. Antibióticos	17
4.2.5. <i>Stress</i>	18
4.3. Influência do microbioma nos processos fisiológicos	20
5. O eixo microbioma-intestino-cérebro	22
5.1. Vias de comunicação entre o microbioma e o cérebro	22
5.1.1. Via neural	23
5.1.2. Via neuroendócrina.....	24
5.1.3. Via imunológica.....	25
6. As doenças neurodegenerativas e a sua conexão com o microbioma	27
6.1. Vias comuns de neurodegeneração	27
6.2. Disbiose nas doenças neurodegenerativas.....	28
6.2.1. Doença de Alzheimer.....	29
6.2.2. Doença de Parkinson.....	31

6.2.3. Esclerose Lateral Amiotrófica	33
6.2.4. Esclerose Múltipla	34
7. Impacto do microbioma nas doenças neurodegenerativas: Perspetivas futuras	36
8. Conclusão	38
Referências Bibliográficas	40

Índice de Figuras:

Figura 1. Caracterização proporcional dos filos constituintes da microbiota intestinal	14
Figura 2. Fatores que influenciam o microbioma intestinal.....	19
Figura 3. Vias de comunicação entre a microbiota e o cérebro.....	26
Figura 4. Danos oxidativos e processos inflamatórios como base para a ocorrência de neurodegeneração	29

Índice de Tabelas:

Tabela 1. Alterações na microbiota intestinal provocadas por antibióticos	18
---	----

1 Introdução

Há mais de 2000 anos atrás, Hipócrates, considerado o pai da medicina, dizia: “*Todas as doenças começam no intestino*”. Esta frase ganha um novo sentido numa altura em que o papel do microbioma intestinal na saúde tem vindo a ganhar cada vez mais destaque. Nos últimos anos tem-se verificado um número crescente de estudos que pretendem identificar os constituintes do microbioma, analisar o genoma microbiano, caracterizar as interações entre o microbioma e o hospedeiro ou determinar qual a sua influência em processos fisiopatológicos de doenças.

Com os avanços tecnológicos que se observaram nos últimos anos, tem sido possível obter cada vez mais evidências de que a ação do microbioma não se restringe apenas ao trato gastrointestinal (TGI), demonstrando também ter um papel ativo em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos no sistema nervoso central (SNC) (1). Esta ação no SNC é possível devido à comunicação bidirecional entre o cérebro e o intestino efetuada através do EMIC. O aumento da investigação científica nesta área demonstrou que desregulações neste eixo poderão estar implicadas na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como a DA, DP, EM e ELA.

Com o aumento da esperança média de vida da população, é expectável que a incidência e prevalência destas doenças tenham tendência para aumentar, no entanto os avanços na descoberta de novos alvos terapêuticos não têm sido muito significativos. Por esta razão, a comunidade científica sentiu necessidade de ampliar horizontes e, com base na evidência da existência de um eixo de comunicação bidirecional entre o microbioma intestinal e o cérebro, surgiu o interesse em estudar o microbioma como possível modulador dos processos fisiopatológicos das doenças neurodegenerativas.

2 Objetivos

Esta monografia pretende resumir o conhecimento atual existente acerca do eixo microbioma-intestino-cérebro e o seu impacto no neurodesenvolvimento e, sobretudo, na neurodegeneração. O principal objetivo desta monografia é evidenciar a potencial relação entre o microbioma intestinal e os processos patológicos que resultam em doenças neurodegenerativas como a DA, DP, EM e ELA.

Com esta revisão bibliográfica pretende-se estabelecer uma melhor compressão desta relação e ainda avaliar se é suficientemente robusta para constituir uma base para a criação de novas abordagens terapêuticas para estas doenças, que até aos dias de hoje ainda não apresentam cura.

3 Métodos

Para a realização desta monografia foi efetuada uma análise da literatura com base na revisão de artigos científicos pesquisados em vários motores de busca como o PubMed, Google Scholar, Nature e ClinicalTrials. Os principais termos pesquisados foram: “*microbiome*”, “*disbiosis*”, “*neurodegenerative diseases*”, “*microbiome-gut-brain axis*” “*Alzheimer’s disease*”, “*Parkinson’s disease*”, “*multiple sclerosis*” “*amyotrophic lateral sclerosis*”, “*neuroinflammation*” e “*fecal microbiota transplantation*”. A pesquisa iniciou-se a 9 de janeiro de 2021 e terminou a 21 de maio de 2021.

Como critério de inclusão dos artigos encontrados foi dada preferência aos publicados após 2014, no entanto, de modo a confirmar informações incluídas nesses artigos foi necessário consultar referências bibliográficas neles mencionadas, sendo algumas anteriores a esta data, mas nunca anteriores a 2002. Em contrapartida, os artigos encontrados que não forneciam informação adicional relevante foram excluídos.

4 Microbiota e microbioma

Estima-se que o TGI seja habitado por cerca de 10^{13} a 10^{14} bactérias (2), que existem simbioticamente com o ser humano (3). Para além de bactérias, o TGI é também colonizado, ainda que de forma menos expressiva, por arqueobactérias, vírus e eucariontes unicelulares. À comunidade formada por estes microrganismos dá-se o nome de microbiota, que em conjunto com os seus metabolitos e genomas formam o microbioma (4). O conjunto de células bacterianas que coloniza o intestino contém cerca de 150 vezes mais genes do que o genoma humano completo (5), o que representa 99% do total de genes no organismo humano (6).

Por ter uma expressão tão significativa no organismo humano, o papel das bactérias reveste-se de particular importância, sendo que, nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado o seu impacto na saúde do hospedeiro, sendo este cada vez mais reconhecido devido à sua conexão com vários órgãos, inclusive o cérebro (3). Assim, esta monografia irá ter um maior foco nas bactérias, em detrimento dos restantes constituintes da microbiota.

O microbioma participa numa grande variedade de processos fisiológicos como a homeostase energética, o metabolismo, a atividade imunológica, a sinalização endócrina, a saúde do epitélio intestinal e o desenvolvimento neurológico e comportamental (4,7) pelo que modulam fortemente a saúde do organismo.

4.1 Caracterização da microbiota intestinal

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas tecnologias permitiram a identificação filogenética dos constituintes da microbiota intestinal ao analisar ácidos nucleicos diretamente extraídos de fezes, sendo que a sequenciação do gene 16S do RNA ribossomal (16s rRNA), uma região conservada do genoma bacteriano que apresenta sequências hipervariáveis entre as espécies, é a técnica mais utilizada para caracterizar a diversidade e abundância do microbioma em termos de microrganismos bacterianos (8). Mais recentemente, começaram a ser utilizadas novas técnicas metagenómicas, nomeadamente a sequenciação *shotgun* que permite a análise completa do genoma, tornando possível o estudo taxonómico e a identificação de microrganismos não bacterianos que são excluídos da sequenciação 16s rRNA (4).

O perfil microbiano do TGI não é constante ao longo de toda a sua extensão: o intestino é a porção do TGI onde se verifica não só uma maior quantidade de bactérias, mas também uma maior diversidade (9).

Existe uma enorme diversidade de espécies bacterianas, o que se reflete numa grande variabilidade na composição da microbiota entre diferentes indivíduos, não sendo possível definir qual o microbioma intestinal “normal” ou “saudável” (10). Cada indivíduo tem o seu próprio microbioma, é como se de uma impressão digital se tratasse. Para além disso, a microbiota intestinal é dinâmica e ao longo da vida do hospedeiro, em resposta a diversos fatores, sofre alterações (9).

Apesar desta variabilidade interindividual há bactérias que são transversais a todos os microbiomas, sendo possível destacar dois filós como os principais constituintes da microbiota intestinal: o filo *Firmicutes* que inclui os géneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Ruminococcus* (8), e o filo *Bacteroidetes*, que inclui os géneros *Bacteroides* e *Prevotella* (2,10). Em minoria existem os filós *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrumicrobia* e *Lentisphaerae* (11) (Figura 1).

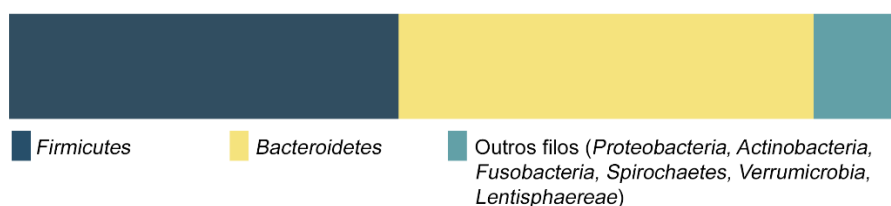


Figura 1: Caracterização proporcional dos filós constituintes da microbiota

Através de um estudo metagenómico foi possível identificar três grupos distintos, mais conhecidos como enterotipos, em que cada um é dominado por um género bacteriano diferente: *Bacteroides* (enterotipo I), *Prevotella* (enterotipo II) ou *Ruminococcus* (enterotipo III). Fatores como o sexo, idade ou índice de massa corporal não influenciam os enterotipos, sendo que estes são também transversais a vários continentes (12).

4.2 Fatores que influenciam a composição do microbioma

O microbioma intestinal é dinâmico, uma vez que, tanto a curto como a longo prazo, é influenciado por diversos fatores que promovem a sua modificação. Estes fatores incluem, por exemplo, o tipo de parto e alimentação, a idade, o tipo de dieta adotada por cada indivíduo, a utilização de antibióticos, o *stress* e a idade (Figura 2).

4.2.1 Primeira colonização

Hoje em dia há evidência de que a colonização intestinal se inicia ainda no útero (13,14), no entanto, a maioria da microbiota é adquirida pelo recém-nascido durante

e após o parto. As primeiras bactérias a colonizar o intestino neonatal são as aeróbias ou anaeróbias facultativas, como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* e Enterobacterias (15). Com a sua multiplicação o consumo de O₂ aumenta, o que favorece a proliferação de bactérias estritamente anaeróbias, como *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.* e *Bacteroides spp.*, sendo que o género que normalmente predomina na microbiota infantil é o *Bifidobacterium* (16), que promove a produção de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) ao participar na fermentação de galactooligosacáridos (GOS) (8). Logo no microbioma dos recém-nascidos verifica-se uma grande variabilidade interindividual, sendo que a primeira colonização irá depender principalmente de fatores como o tipo de parto (vaginal ou cesariana) e do tipo de alimentação (leite materno ou fórmulas lácteas) (17).

Os intestinos dos recém-nascidos, durante o parto, são colonizados pelos microrganismos com os quais entram em contacto. Assim, a microbiota intestinal de bebés nascidos por parto vaginal é muito semelhante à microbiota vaginal da sua mãe, o que se reflete numa colonização pelos géneros *Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.* e *Sneathia spp.*, enquanto que a microbiota dos que nascem por cesariana é caracterizada por um perfil microbiológico muito semelhante ao encontrado na pele (4), o que inclui bactérias como *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* (10,17). Estudos demonstram que bebés que nascem por cesariana, quando comparados com bebés nascidos por parto vaginal, têm uma população de *Bacteroidetes* diminuída em relação a *Firmicutes*, pelo que são normalmente mais colonizados por *Clostridium difficile* (18,19)

Após o parto, o tipo de alimentação também parece ser um fator determinante na modulação do microbioma. O leite materno para além de não ser estéril, é rico em prebióticos importantes para o desenvolvimento do microbioma (19). Os oligossacáridos, prebióticos encontrados no leite materno, estimulam seletivamente o crescimento de bactérias do género *Bifidobacterium* (20,21), o que se reflete numa maior proporção de bactérias deste género no microbioma de bebés em amamentação quando comparado com o de bebés alimentados por fórmulas lácteas (22), que apresentam níveis mais elevados de *Lactobacillus spp.* e bactérias potencialmente patogénicas como *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis* (23).

Após a ablactação e a introdução de comida sólida, a microbiota continua a modificar até que, entre os 2 e os 3 anos de idade, é estabelecido um microbioma mais complexo e estável, semelhante ao do adulto (24).

4.2.2 Idade

Aos 3 anos de idade a microbiota, até então dominada pelo género *Bifidobacterium* (filo *Actinobacteria*), altera-se para uma microbiota dominada pelos filios *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (25), mantendo-se relativamente estável durante a idade adulta sendo apenas transitoriamente alterada por fatores externos, como a dieta ou antibioterapia (26). Em idades mais avançadas esta estabilidade não é tão evidente, uma vez que alterações típicas do avanço da idade, como a deterioração da dentição, da função salivar e redução do tempo do trânsito intestinal, parecem influenciar o microbioma (17), que se torna menos diversificado (27).

A microbiota de indivíduos idosos foi estudada pelo consórcio ELDERMET, que apurou que algumas das grandes diferenças em relação à microbiota de indivíduos mais jovens está relacionada com um rearranjo no filo *Firmicutes*, nomeadamente uma alteração nas proporções dos *clusters* de *Clostridium* (28). O número de *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.* e *Faecalibacterium prausnitzii*, assim como o de *Bifidobacterium spp.*, está diminuído (29,30), o que resulta num decréscimo da atividade amilolítica e da disponibilidade de SCFA. Por outro lado, foi observado um enriquecimento em bactérias do filo *Proteobacteria*, nomeadamente da família *Enterobacteriaceae*, e de *Clostridium spp.* (31), assim como um aumento na atividade proteolítica (32).

4.2.3 Alimentação

A dieta é considerada um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do microbioma ao longo de toda a vida. Há evidência de que a dieta influencia a abundância relativa entre filios e grupos específicos de bactérias (15), sendo que padrões de dieta de longa duração foram identificados como um fator determinante para a estabilização de dois dos três enterotipos reconhecidos (33). Uma dieta de padrão ocidental, caracterizada por elevados teores de proteína e gordura, está associada ao enterotipo *Bacteroides*, enquanto que, uma alimentação predominantemente vegetariana, rica em hidratos de carbono, está associada ao enterotipo *Prevotella* (33).

Ao introduzir mudanças na dieta, rapidamente são detetadas alterações na composição do microbioma, que podem ser revertidas de forma igualmente rápida (34)(35), ainda assim, o enterotipo, a curto prazo, mantém-se estável, indicando que este apenas é influenciado por padrões dietéticos de longa duração (33).

De Filippo et al. (36) comparou o microbioma fecal de crianças africanas naturais de uma vila rural de Burkina Faso, normalmente alimentadas com leite materno até

aos 2 anos de idade assumindo depois uma dieta predominantemente vegetariana, com o de crianças europeias, alimentadas com leite materno até cerca de 1 ano de idade sendo posteriormente alimentadas com uma dieta de padrão ocidental. Neste estudo, apurou que nas crianças de Burkina Faso a microbiota fecal apresentava um enriquecimento em bactérias do filo *Bacteroidetes* (maioritariamente *Prevotella spp.* e *Xylanibacter spp.*) e um número reduzido de bactérias do filo *Firmicutes*, quando comparado com a de crianças europeias, que apresentavam níveis elevados de *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *Shigella spp.* e *Escherichia spp.*. Em ambas as populações foram encontradas bactérias produtoras de SCFA, no entanto, nas crianças de Burkina Faso, por se verificar uma maior abundância de bactérias dos géneros *Prevotella* e *Xylanibacter*, que hidrolisam xilano, xilose e carboximetilcelulose, há maior produção de SCFA, sendo que esses níveis estão significativamente reduzidos nas crianças europeias.

As dietas ricas em frutos, vegetais e fibras foram associadas a uma maior diversidade microbiana, tanto a nível genómico como taxonómico (29,37). Zimmer et al. (38) comparou a microbiota fecal de indivíduos estritamente veganos ou vegetarianos com a de indivíduos consumidores de uma dieta omnívora. Chegou à conclusão de que os números totais de *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli* e *Enterobacteriaceae spp.* estão diminuídos em indivíduos veganos. Uma dieta vegana implica o consumo de maiores quantidades de hidratos de carbono e fibras, o que se reflete na produção de maiores quantidades de SCFAs pelas bactérias. Com a produção de SCFAs verifica-se uma diminuição do pH luminal para valores entre 5,5 e 6,5. Estes valores de pH não são promotores do crescimento de *E. coli* ou Enterobacterias, o que se reflete numa contagem diminuída das mesmas.

As circunstâncias de vida de cada indivíduo podem ditar alterações nos padrões de dieta, particularmente em fases de vida mais avançadas. Idosos que vivem em comunidade têm uma alimentação mais variada do que os que vivem em residências de longa duração, o que, nestes últimos, se reflete numa microbiota intestinal com menor variedade (28).

4.2.4 Antibióticos

O tratamento com antibióticos tem demonstrado ter uma enorme influência na microbiota intestinal. Estes fármacos não são seletivos para bactérias patogénicas, pelo que são também responsáveis pela supressão do crescimento de determinadas bactérias comensais no intestino, o que poderá resultar numa maior colonização por parte de outras menos benéficas.

Muito frequentemente, o tratamento com antibióticos de largo espectro em idosos leva a um desequilíbrio entre *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, aumentando a proporção dos primeiros em relação aos segundos (28). Bactérias anaeróbias comensais como *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* estão frequentemente diminuídas ou mesmo erradicadas com o uso de antibióticos (39,40,41), o que pode facilitar a colonização do intestino por bactérias oportunistas, como *Clostridium difficile*, aumentando a produção de toxinas, provocando diarreia (42).

Consoante a classe do antibiótico, dose e período de exposição verificam-se alterações distintas na microbiota (43) (Tabela 1), no entanto, de uma forma geral e transversal a qualquer antibioterapia, ocorre uma diminuição da diversidade e abundância bacteriana. Normalmente, a microbiota volta a assumir um estado semelhante ao que se verificava antes do tratamento ao fim de alguns dias ou semanas (28), mas há relatos de situações em que as alterações se mantêm durante longos períodos de tempo após o fim do tratamento (44).

Tabela 1. Alterações na microbiota intestinal provocadas por antibióticos.
Adaptado de (43)

Legenda: ↓ Níveis diminuídos; ↑ Níveis aumentados

Antibiótico	Alterações na microbiota	Referência
Claritromicina	<i>Bacteroides spp.</i> ↑ <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Actinobacteria</i> ↓ <i>Firmicutes</i> ↓	(39)
Clindamicina	<i>Lactobacillus spp.</i> ↓ <i>Bifidobacterium</i> ↓	(40)
Ciprofloxacina	<i>Actinobacteria</i> (<i>Bifidobacterium spp.</i>) ↓ <i>Bacteroidetes</i> (<i>Alistipes spp.</i>) ↓ <i>Firmicutes</i> (<i>Faecalibacterium spp.</i> , <i>Oscillospira spp.</i> , <i>Ruminococcus spp.</i> e <i>Dialister spp.</i>) ↓ <i>Bacteroidetes</i> (<i>Bacteroides</i>) ↑	(41) (40)
Macrólidos	<i>Bacteroides</i> ↑ <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Actinobacteria</i> ↓ <i>Firmicutes</i> ↓ Diversidade total ↓	(45)
Vancomicina	<i>Firmicutes</i> ↓ <i>Proteobacteria</i> ↑	(46)

4.2.5 Stress

O *stress* pode resultar de várias situações a que cada indivíduo é exposto, pelo que subjacente a este podem estar causas ambientais, fisiológicas, físicas ou psicológicas. Há evidência de que o *stress* medeia alterações patológicas que

aumentam a suscetibilidade do organismo para doenças, sendo inclusive um fator promotor de desequilíbrios no microbioma - situação designada por disbiose (47).

O efeito do *stress* na microbiota intestinal inicia-se ainda antes do nascimento e mantém-se durante toda a vida. Murakami et al. (48) estudou as alterações na microbiota intestinal induzidas pelo *stress* provocado pela separação da progenitora, verificando uma diminuição na abundância de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* e um aumento de *Clostridium spp.*. Estas alterações são semelhantes às induzidas pela exposição a *stress* social (49).

Os mecanismos através dos quais o *stress* influencia a microbiota ainda não são conhecidos, mas poderão estar relacionados com alterações do habitat microbiano provocadas por mudanças da motilidade intestinal e da secreção de mucina. Para além disso, o *stress* ao aumentar os níveis de noradrenalina, poderá interferir com a expressão de genes bacterianos virulentos (50).



Figura 2: Fatores que influenciam o microbioma intestinal

4.3 Influência do microbioma em processos fisiológicos

Com o estudo do microbioma intestinal, a influência deste nos processos fisiológicos do organismo tem-se tornado cada vez mais evidente, sendo notória, principalmente, em processos metabólicos, imunológicos e de proteção da mucosa (51).

As bactérias colonizadoras do intestino são essenciais para processos básicos como a digestão, uma vez que possuem enzimas que têm a capacidade de fermentar hidratos de carbono complexos não digeridos, permitindo a extração de nutrientes e metabolitos como os SCFAs, em que se incluem o acetato, propionato e butirato (47). Os SCFAs têm um papel relevante a vários níveis: para além de serem fontes de energia, de atuarem nos recetores acoplados à proteína G, de serem inibidores das desacetilases das histonas, influenciando, por sua vez, processos de regulação celular como a expressão génica (52), também aumentam a imunidade através da produção de IgA pelas células plasmáticas (53) e inibem o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), o que se reflete numa redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (54). O butirato, particularmente, é amplamente reconhecido como um agente promotor de saúde, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antineoplásicos (47) e promotores da função da barreira intestinal, atenuando a translocação bacteriana ao alterar as junções célula-célula (*tight-junctions*) e a produção de mucina (52).

A microbiota intestinal contribui ainda para a modulação de respostas imunológicas inatas e adaptativas (51). Um dos principais mecanismos de defesa providenciados pela microbiota é limitar o acesso de bactérias patogénicas ao epitélio intestinal por exclusão competitiva. A imunidade local é alcançada através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como os lipopolissacáridos (LPS), por recetores, como os Toll-like (TLR), presentes, por exemplo, nas células epiteliais intestinais (IEC), que quando ativados promovem a produção de péptidos antimicrobianos (AMP) como as defensinas, catelicidinas e lectinas tipo C (51). A microbiota é ainda importante para o desenvolvimento normal do tecido linfático associado ao intestino (GALT) (55) e para a estimulação da resposta das células T_{helper} (Th) 17, importantes na proteção contra infeções fúngicas e bacterianas (54).

Outros papéis relevantes da microbiota são a síntese de vitamina K e algumas vitaminas do complexo B, transformação de polifenóis em compostos bioativos, desconjugação dos ácidos biliares primários e convertendo-os em secundários, que são passivamente absorvidos no cólon, e metabolismo de xenobióticos (51,55).

Para além de todos os processos já mencionados, a microbiota tem sido ainda associada à produção de moléculas neurologicamente ativas como a serotonina (5HT), melatonina, ácido gama-aminobutírico (GABA), catecolamina, acetilcolina (ACh) e histamina (19), sendo que cerca de 90% da 5HT e 50% da dopamina proveniente do intestino são produzidos por intervenção de bactérias intestinais. Há evidência de que os SCFAs induzem a ação da triptofano hidroxilase-1 em células enterocromafins (CEC) sintetizando 5HT (55).

A ação do microbioma, apesar de se iniciar no TGI, não se limita a este, uma vez que se expande ao SNC comunicando com o mesmo através do EMIC, pelo que tem um papel importante em diversas questões neurológicas, nomeadamente, no desenvolvimento neuronal, na capacidade cognitiva e de memorização e na resposta ao *stress* e ansiedade.

5 O eixo microbioma-intestino-cérebro

Durante a última década tem-se verificado uma mudança de paradigma na compreensão do EMIC, sendo notório o crescimento da evidência das interações entre o TGI e o SNC.

O EMIC é um sistema bidirecional que permite a comunicação entre o microbioma e o cérebro, e vice-versa (2). Por um lado, o microbioma pode ser afetado pelo cérebro na sequência de modificações na motilidade gastrointestinal, funções secretórias e reações imunológicas que, por sua vez, podem levar a alterações das condições do ambiente em que se inserem os microrganismos (56). Por outro lado, o microbioma pode, ele próprio, ter influência e repercussões no SNC, uma vez que muitas das hormonas e metabolitos secretados pela microbiota e pelas CEE interferem com as vias bioquímicas que influenciam o SNC, criando um meio de comunicação direto entre o ambiente externo, que contacta com a microbiota intestinal, e o cérebro, que está protegido pela barreira hematoencefálica (BHE) (3).

Este eixo atua como um sistema fisiológico complexo, através da ação combinada do microbioma intestinal, do sistema nervoso entérico (SNE), sistema nervoso parassimpático (SNP), sistema nervoso simpático (SNS), SNC, conexões neuroendócrinas, vias humorais, citocinas, neuropéptidos e moléculas sinalizadoras, que no seu conjunto permitem a comunicação entre o TGI e SNC (3). O microbioma é agora visto como um componente chave deste eixo, e perturbações na homeostase ou desregulação do mesmo podem estar relacionados com doenças psiquiátricas, neurológicas e neurodegenerativas (19).

5.1 Vias de comunicação entre o microbioma e o cérebro

Ainda hoje, o exato mecanismo de comunicação entre o microbioma, intestino e cérebro não está completamente esclarecido, mas há uma evidência crescente que a interação entre a microbiota e o hospedeiro ao nível do intestino leva à libertação de vários compostos, como citocinas, quimiocinas, neurotransmissores, neuropéptidos, hormonas, metabolitos microbianos. Estas moléculas podem entrar na circulação sanguínea e linfática ou criar sinais que são detetados pelos aferentes vagais ou espinhais que, de forma constante, comunicam com o cérebro.

Esta comunicação poderá ocorrer por três vias principais: a via neural, caracterizada por sinais emitidos pelo microbioma que são transmitidos ao SNC pelo nervo vago; a via neuroendócrina, na qual os metabolitos formados pela microbiota

intestinal entram na circulação sanguínea, podendo regular funções neurológicas; e, por último, a via imunológica, em que os microrganismos modulam a resposta imunitária ao produzir PAMPs que promovem a produção e ativação de células imunitárias e citocinas que afetam o SNC (3,56).

5.1.1 Via neural

Esta via de comunicação entre o microbioma e o cérebro inicia-se com a deteção, por parte do sistema nervoso entérico (SNE), de sinais emitidos pelo microbioma. Estes sinais são transmitidos ao SNC pelo nervo vago (NV), um nervo craniano que se estende desde o cérebro até ao intestino, sendo a via de comunicação mais rápida entre estes dois órgãos. As suas fibras, 80% aferentes e 20% eferentes, inervam tanto a camada muscular do intestino, como a mucosa e, mais recentemente, foi descrita uma conexão com as células enteroendócrinas (CEE) (6).

O NV não se projeta diretamente no lúmen, no entanto bactérias neuroativas podem alterar a sinalização vagal aferente de dois modos: ao modificar a atividade contrátil do intestino, o que será detetado pelos mecanorreceptores intramusculares e intraganglionares, ou ao ativar os quimiorreceptores presentes nas microvilosidades da mucosa e algumas células epiteliais, através de diversas substâncias, como os SCFA, que podem ser transportados através da barreira epitelial, ou mediadores parácrinos como a histamina, colecistocinina (CCK), ATP ou GLP-1 (57).

Vários estudos em animais demonstram o papel fundamental do NV para uma adequada sinalização bidirecional microbioma-cérebro. Num estudo, no qual foram administradas doses orais subclínicas de *Campylobacter jejuni*, verificou-se um aumento significativo na expressão de c-fos em neurónios bilaterais dos gânglios vagais e núcleos sensoriais viscerais ativados no tronco cerebral, mesmo na ausência de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (58). Em ratos inoculados com *Salmonella typhimurium*, após vagotomia subdiafragmática, verificou-se não só uma expressão atenuada de c-fos, como também uma diminuição das percentagens de células T CD8+ (59). Noutro estudo, Bravo et al. (60) demonstrou que o tratamento crónico com *Lactobacillus rhamnosus* reduziu a produção de corticosterona associada ao stress e comportamentos relacionados com ansiedade e depressão, no entanto, estes efeitos benéficos não se verificaram em ratos submetidos a vagotomia, indicando que este nervo é crucial para a comunicação entre o microbioma intestinal e o cérebro.

Apesar da evidência que implica o NV como via de comunicação entre o microbioma e o cérebro, ainda não foi possível mapear as redes neuronais subjacentes ao EMIC de forma detalhada.

5.1.2 Via neuroendócrina

Outra via importante através da qual o microbioma comunica com o SNC envolve as CEE do intestino. Estas células estão intercaladas com as células epiteliais do intestino ao longo de todo o seu comprimento e contêm mais de 20 tipos de moléculas sinalizadoras. A microbiota intestinal pode atuar em conjunto com as CEE, que têm a capacidade de produzir diversos fatores neuroativos, como o péptido YY (PYY), triptofano e histamina. Alguns destes fatores neuroativos podem entrar na circulação sanguínea, resultando numa possível influência sobre o SNC, nomeadamente, através da estimulação da produção de hormonas intestinais no SNC, como a grelina e ácido indol-3-propiónico, que apresentam funções neuroprotetoras.

As próprias bactérias libertam metabolitos neuroativos, como o GABA (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus spp.*), noradrenalina (*Bacillus*, *Escherichia* e *Enterococcus spp.*), 5HT (*Enterococcus* e *Streptococcus spp.*), dopamina (*Bacillus spp.*) e acetilcolina (*Lactobacillus spp.*) (2,61); têm ainda a capacidade de regular a produção de neurotransmissores ao alterar os níveis dos seus precursores (2): foi demonstrado que *Bifidobacterium infantis* aumenta os níveis de triptofano influenciando a síntese de 5HT (62). Estes neurometabolitos podem influenciar o SNC ao estimular localmente os aferentes vagais, de forma indireta atuando no SNE, ou através da sua ação endócrina distal após serem absorvidas para a circulação sanguínea (3).

No que toca à comunicação entre o microbioma e o SNC, os SCFAs também têm um papel importante, uma vez que há evidência que estes compostos influenciam de forma bastante relevante processos neurológicos e cognitivos (63). Os SCFAs ao interagir com os seus recetores nas CEE promovem uma comunicação indireta com o cérebro, uma vez que induzem a secreção de hormonas intestinais como o GLP1, PYY, assim como GABA e 5HT (64); ao ativar os recetores de ácidos gordos livres (FFAR), promovem a libertação de glucose que resulta na propagação de sinais através do SNE (3); parecem ativar o sistema nervoso simpático (SNS) e aliviam a inflamação intestinal (61). Verificou-se ainda que no SNC os SCFAs também influenciam o estado de inflamação cerebral ao alterar a morfologia e função das células gliais, assim como modulando os níveis de fatores neurotróficos, como o fator

de crescimento de nervo (NGF) ou o fator neurotrópico derivado da célula glial (GDNF) que regulam o crescimento, sobrevivência e diferenciação de neurónios e sinapses no SNC, tendo ainda um papel importante na aprendizagem e memória (64).

Um mecanismo de extrema importância influenciado pela microbiota intestinal é a modulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (EHHA) e a consequente libertação de cortisol, que suprime a resposta inflamatória e influencia numa grande variedade de processos neurológicos. Este eixo é o principal responsável pela resposta ao *stress* e é influenciado pela microbiota: em ratos *germ-free* (GF) verificaram-se níveis mais elevados de corticosterona em resposta ao *stress* do que em ratos colonizados de forma convencional (65)(66), sendo que esta resposta exagerada foi revertida após colonização com *Bifidobacterium infantis* (66).

5.1.3 Via imunológica

O TGI tem uma grande densidade de células imunitárias na sua constituição estando em constante comunicação com o microbioma intestinal, quer seja por contacto físico direto ou por libertação de compostos secretados pelas bactérias, sendo importantes para a manutenção da homeostase entre a microbiota e o hospedeiro, no entanto, atuam também como intermediárias entre a microbiota intestinal e o cérebro (19).

Conforme mencionado anteriormente, a microbiota intestinal contribui para a modulação de respostas imunológicas inatas e adaptativas ao libertar certos compostos, como LPS ou peptidoglicanos (19,51). Quando a integridade da mucosa é comprometida, bactérias Gram-negativas que expressam LPS podem ser translocadas do intestino para a circulação sistémica levando a uma ativação da imunidade periférica (19), através de TLRs que estão expressos não só em células imunitárias, como também em células do SNC, como os neurónios e as células gliais (67). As microglias são as células imunitárias mais abundantes do SNC. Constituindo 5-12% de todas as células gliais, as microglias têm a capacidade de detetar alterações no meio molecular circundante e quando ativadas libertam citocinas, quimiocinas, expressam marcadores de antigénio, regulam neurotransmissores e alteram a sua morfologia, o que lhes confere capacidade de efetuar fagocitose (6,67).

Erny et al. (68) confirmou que há uma relação entre as células imunitárias cerebrais, as microglias, e o microbioma intestinal, uma vez que em ratos GF estas células exibiram defeitos globais nas suas proporções celulares e apresentavam fenótipo imaturo, o que resultou em respostas imunes defeituosas: a ativação

microglial após administração de LPS estava diminuída em ratos GF, o que sugere que a microbiota é essencial para uma resposta neuroimune adequada. O mecanismo pelo qual o microbioma influencia as microglias não está completamente esclarecido, no entanto as alterações nas microglias encontradas em ratos GF são normalizadas após suplementação com SCFAs, indicando que estes compostos poderão eliminar as anomalias destas células.

A sinalização entre o intestino e o cérebro mediada por citocinas é outra via de comunicação documentada. Devido à interação entre a microbiota e o hospedeiro ocorre produção de citocinas no intestino, que depois entram na circulação sistêmica (6). Em condições fisiológicas normais as citocinas não passam a BHE, no entanto há evidência de que conseguem influenciar áreas onde esta barreira não é completamente íntegra, como o hipotálamo e os órgãos circunventriculares. É através deste último mecanismo que as interleucinas (IL)-1 e 6 ativam o EHHA, o que resulta na produção de cortisol (69).

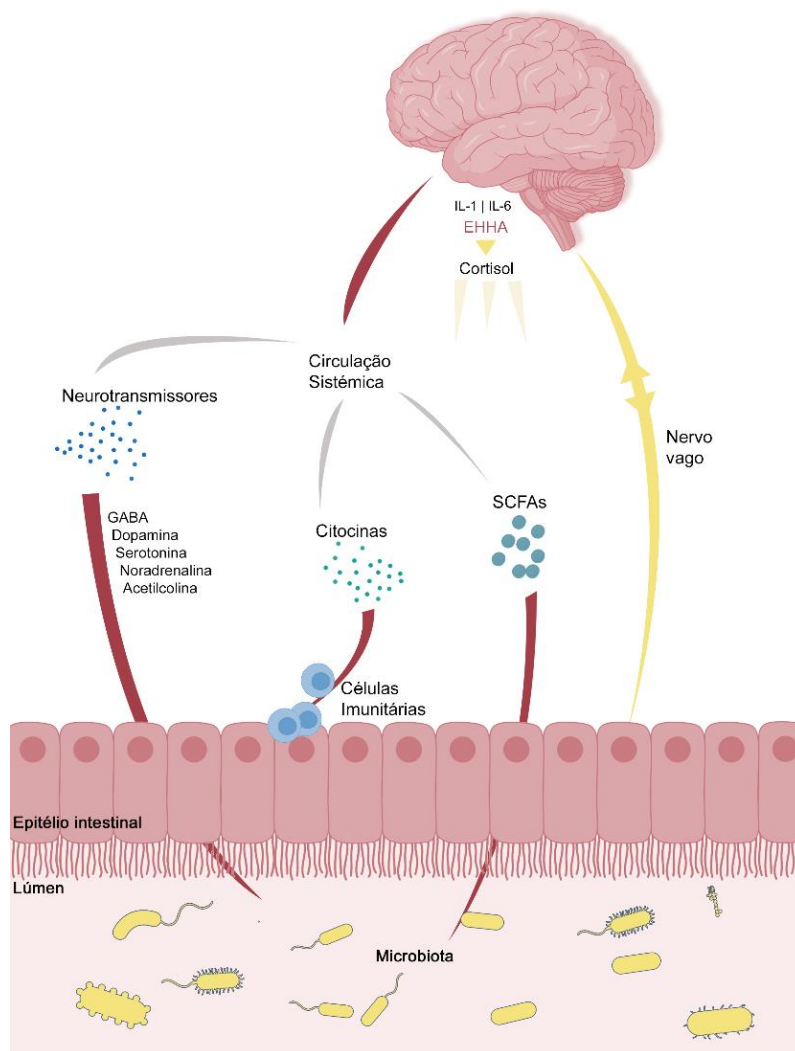


Figura 3: Vias de comunicação entre a microbiota e o cérebro

6 As doenças neurodegenerativas e a sua conexão com o microbioma

Hoje em dia, há já evidência consistente de que modificações no microbioma podem ter efeitos moleculares benéficos e influenciar positivamente o neurodesenvolvimento e a neuroprotecção. Por outro lado, nos últimos anos, o estudo da relação existente entre o microbioma e a ocorrência de processos neurodegenerativos tem aumentado consideravelmente, havendo já dados pré-clínicos e clínicos que permitem relacionar a disbiose com um grande espectro de doenças neurodegenerativas (70) no qual se incluem a DA, a DP, a EM e a ELA. Apesar de cada uma destas doenças apresentar características fisiopatológicas e manifestações fisiológicas diferentes, a microbiota intestinal e os seus metabolitos, em situações de disbiose, por desempenharem vários papéis no organismo, podem participar em determinados processos fisiopatológicos comuns no envelhecimento e associados a doenças neurodegenerativas (3).

6.1 Vias comuns de neurodegeneração

Com o envelhecimento é comum ocorrerem várias alterações fisiológicas. Estas alterações, em determinadas situações, podem provocar inflamação e danos oxidativos, que são duas das principais causas do início ou agravamento de processos neurodegenerativos.

Os danos oxidativos são provocados por espécies oxidativas reativas (ROS) que normalmente são convertidas em compostos inofensivos pelos sistemas de defesa antioxidante das células, no entanto, com a idade ocorre uma perda progressiva destas defesas, o que resulta numa acumulação de danos celulares, genéticos e membranares (3). Os neurónios são gravemente afetados pelos ROS, sendo que a sua ação pode mesmo resultar na morte celular (71). A acumulação lenta de ROS nos neurónios, através da ativação da via de sinalização do NF- κ B, resulta na estimulação da libertação de citocinas pro-inflamatórias que consequentemente promove a ativação microglial e a neuroinflamação (3), que são caracterizadas por um aumento da produção de radicais livres, como ROS e espécies reativas de azoto (RNS) (71). Para além do exposto, uma das características do próprio processo de envelhecimento é o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (72). Assim, a combinação dos danos oxidativos e dos processos inflamatórios próprios do envelhecimento cria um ciclo vicioso conhecido como “*inflamm-aging*” (Figura 4), sendo este a base comum para um amplo espectro de patologias relacionadas com a

idade, nomeadamente as doenças neurodegenerativas (72). O “*inflamm-aging*” é definido como um estado crónico de inflamação de baixo grau, caracterizado por níveis elevados de citocinas e mediadores inflamatórios sem que exista uma causa específica (73).

As doenças neurodegenerativas, como DA e DP, apresentam processos patológicos diferentes, no entanto, têm em comum algumas particularidades, nomeadamente a acumulação e agregação anormal de proteínas específicas da doença, que parecem induzir processos neurodegenerativos. Estudos recentes indicam que estas proteínas se podem alastrar de uma célula ou área do cérebro para outra, induzindo o *misfolding* proteico em zonas anteriormente não afetadas. Os exatos mecanismos que promovem o *misfolding* e acumulação proteica não são ainda bem conhecidos, contudo há evidência de que mutações genéticas e fatores ambientais, como *stress* oxidativo e metabólico, estão relacionados com este processo (74).

6.2 Disbiose nas doenças neurodegenerativas

Na última década, têm surgido cada vez mais estudos a destacar a influência do microbioma intestinal, especialmente em estado de disbiose, no início e progressão de várias doenças neurodegenerativas, sendo que a redução da diversidade da microbiota que se verifica no envelhecimento poderá ser um dos principais fatores responsáveis por este processo (75).

Conforme mencionado anteriormente, a neuroinflamação e o *stress* oxidativo estão intimamente relacionados com a neurodegeneração. O próprio microbioma também desempenha um papel ativo nestes processos: interfere com o estado oxidativo do SNC através da produção de vitaminas (antioxidantes), SCFAs, polifenóis, neurotransmissores e até produtos tóxicos; interfere com estado inflamatório através da produção de LPS que podem levar à ativação de várias vias de sinalização que resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias; estes processos têm ainda maior expressão em situações de disbiose (71), o que poderá agravar o estado oxidativo e de inflamação do cérebro.

Para além do supramencionado, é de realçar que existe uma elevada percentagem de pessoas com doenças neurodegenerativas que também apresentam

distúrbios no TGI, como obstipação ou diarreia (76), sendo que um possível denominador comum entre as duas situações poderá ser um estado de disbiose.

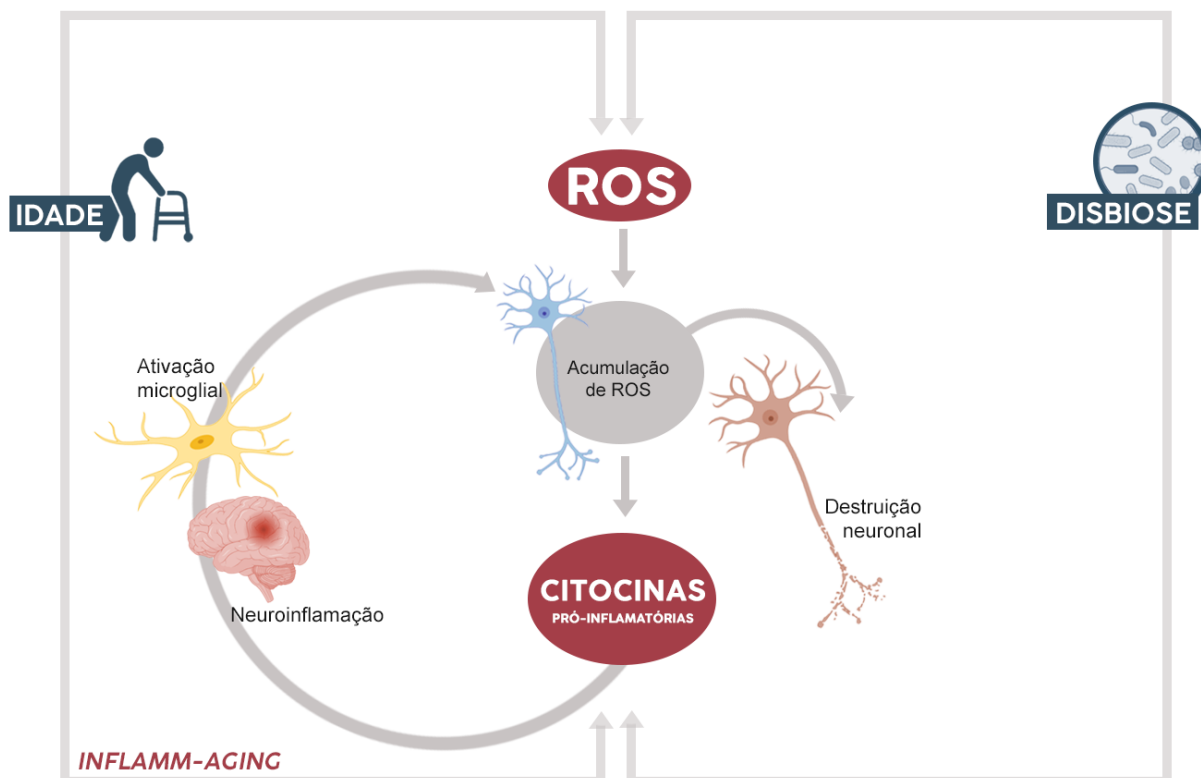


Figura 4: Danos oxidativos e processos inflamatórios como base para a ocorrência de neurodegeneração

6.2.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que leva a uma deterioração global e progressiva de diversas funções cognitivas (77), constituindo a forma mais comum de demência entre os idosos (78). As principais características patológicas da DA incluem a deposição de beta-amiloide (β A) - péptidos que derivam da proteína precursora de amiloides -, de proteínas tau hiperfosforiladas e de emaranhados neurofibrilares no tecido cerebral (79). Uma das consequências da deposição de β A no cérebro é ativação de respostas neuroimunes executadas pelas microglias, que de forma aguda e limitada tem um efeito neuroprotetor, no entanto, de forma crônica, pode suportar processos neurotóxicos que resultam em lesões cerebrais e morte de neurónios (78).

A falta de tratamentos de alvo único eficazes e as falhas em ensaios clínicos, particularmente os relacionados com β A, são evidências de que o conhecimento atual da patogênese da DA deve ser expandido.

Nos últimos anos, cada vez mais evidências têm demonstrado uma correlação entre a disbiose e a ocorrência de DA, principalmente devido à influência do microbioma em processos neuroinflamatórios. Para além da produção de LPS, várias espécies bacterianas, como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus*, têm ainda a capacidade de produzir amiloides que poderão favorecer a patogénese da DA durante o envelhecimento, quando tanto a barreira epitelial intestinal como a BHE se tornam mais permeáveis devido ao fenómeno de “*inflamm-aging*” (77,80).

Estudos em ratos transgênicos modelo da DA (APP_{SWE}/PS1_{ΔE9}) demonstram que mudanças prolongadas da composição e diversidade microbiana induzidas por tratamentos com antibióticos de largo espectro podem diminuir a deposição de placas βA (81). Um outro estudo, também realizado com ratos transgênicos, relacionou a microbiota com a acumulação de placas amiloides nestes ratos; os autores do estudo criaram ratos transgênicos modelo da DA, em condições GF, e verificaram uma redução drástica da deposição de βA em comparação com a verificada nos ratos modelo de controlo, que apresentavam uma microbiota intestinal normal, mas diferente da dos ratos *wild-type* saudáveis. O mais intrigante foi que, após colonização dos ratos GF modelo da DA com microbiota de ratos modelo da DA criados convencionalmente, se verificou um aumento drástico na patologia amiloide cerebral nos primeiros, enquanto a colonização com microbiota dos ratos *wild-type* foi menos eficaz a provocar esse aumento (82).

Pelo tão recente interesse da comunidade científica nesta área, a evidência desta relação em humanos ainda não está completamente esclarecida, no entanto já existem alguns estudos neste âmbito. Vogt et al. (83) caracterizou a composição taxonómica bacteriana de amostras fecais de indivíduos com e sem diagnóstico de DA, verificando que o microbioma intestinal de indivíduos com diagnóstico de DA apresenta uma menor diversidade microbiana, sendo composicionalmente distinto do grupo de controlo de indivíduos com a mesma idade e sexo; foi ainda identificada uma redução na abundância de bactérias do filo *Firmicutes* e género *Bifidobacterium*, e, por outro lado, um aumento da abundância de bactérias do filo *Bacteroidetes* nos indivíduos com DA. Também Zhuang et al. analisou a composição da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e de indivíduos com DA, verificando, nos doentes com DA, níveis significativamente diminuídos de *Bacteroides fragilis*, uma bactéria anti-inflamatória que tem a capacidade de fortalecer a barreira intestinal e reverter a secreção intestinal (84).

Outro estudo transversal observacional demonstrou que os níveis de bactérias dos géneros *Escherichia* e *Shigella* - associados a processos inflamatórios - estão aumentados em amostras fecais de doentes com DA quando comparados com os verificados em indivíduos saudáveis; e que os níveis de *Eubacterium rectale* - bactéria caracterizada como anti-inflamatória - estão diminuídos; esta situação poderá ser uma das justificações para o estado inflamatório que se verifica em doentes com DA (85), no entanto, é necessário ter em consideração que estes resultados provêm de pequenos estudos que abrangem poucos participantes e que serão necessários estudos longitudinais com coortes maiores para avaliar qual é o real envolvimento da microbiota intestinal na progressão da DA.

Foram ainda realizados estudos para investigar qual o papel dos probióticos na função cognitiva. Akbari et al. (86), num ensaio clínico randomizado, duplamente cego, com indivíduos diagnosticados com DA, analisou qual o efeito da suplementação com *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium bifidum*, verificando uma redução de cerca de 18% dos níveis do marcador inflamatório proteína C-reativa no grupo de indivíduos suplementados com probióticos em oposição a um aumento de cerca de 45% no grupo placebo. A suplementação também demonstrou efeitos benéficos na melhoria da função cognitiva em indivíduos com DA.

Em conjunto, todos estes estudos evidenciam que o microbioma tem um papel na regulação de componentes moleculares da DA, que poderão contribuir para o seu desenvolvimento.

6.2.2 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson caracteriza-se por alterações na função motora, observando-se sintomas como acinesia, rigidez muscular, tremor em repouso ou dificuldade em andar e, ainda, por alterações não motoras, que incluem sintomas como demência, depressão, perda de olfato, e disfunções gastrointestinais, nomeadamente náuseas, disfagia, salivação anormal, obstipação e disfunções na defecação. Na DP observa-se uma deposição progressiva de alfa-sinucleína (α -sin) no corpo celular de neurónios, o que resulta na formação de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas, os corpos de Lewy (77); a degeneração da função motora ocorre na sequência da perda de neurónios dopaminérgicos na substância nigra (70).

Está bem estabelecido que as disfunções intestinais, nomeadamente na forma de obstipação, que se verificam em cerca de 80% dos indivíduos diagnosticados com DP (87), podem surgir mesmo antes do início dos sintomas motores típicos (75). Esta

correlação entre a DP e as disfunções intestinais leva ao surgimento da hipótese de que a DP pode ter origem em órgãos periféricos, como o intestino, onde também se verifica acumulação de α -sin, neurodegeneração do SNE, com aumento da inflamação local, *stress* oxidativo e permeabilidade intestinal (87).

Alguma evidência pré-clínica demonstra que a α -sin acumulada no intestino pode ser transportada até ao cérebro através do NV (1). Estudos epidemiológicos demonstraram que há um menor risco de desenvolvimento de DP em doentes vagotomizados (88), o que sugere que o NV pode estar estreitamente envolvido na patogénese da DP.

Na última década, o interesse na associação entre o TGI e a DP tem aumentado após se considerar o microbioma intestinal como um potencial biomarcador ou modificador da doença (89). Um estudo demonstrou que, em ratos modelo de DP, a microbiota intestinal pode promover a agregação de α -sin e evitar a eliminação de proteínas insolúveis através da ativação da microglia em regiões do cérebro envolvidas na acumulação de α -sin (90).

Em termos da composição da microbiota intestinal em indivíduos com DP também se verificaram algumas alterações. Scheperjans et al. (91), verificou uma redução na abundância de espécies bacterianas da família *Prevotellaceae* e, por outro lado, uma maior abundância de *Enterobacteriaceae* nas fezes de doentes com DP. Os membros da família *Prevotellaceae* estão envolvidos na produção de mucina e SCFAs, pelo que a redução desta população resulta num aumento da permeabilidade intestinal e na exposição sistémica a endotoxinas bacterianas que iniciam ou promovem a expressão de α -sin (92). A abundância de *Enterobacteriaceae* foi positivamente associada com a severidade da instabilidade postural e dificuldade na marcha (91). Noutro estudo, a realização de biopsias intestinais permitiu identificar diferenças entre a mucosa do colón sigmóide de indivíduos diagnosticados com DP e indivíduos saudáveis, destacando-se a redução significativa de bactérias do género *Faecalibacterium*, que apresentam propriedades anti-inflamatórias e são produtoras de SCFAs, e o aumento claro nos níveis de bactérias pró-inflamatórias do filo *Proteobacteria*, nomeadamente do género *Ralstonia* (93). Apesar de tudo o que foi exposto, ainda não foi alcançado um consenso sobre se existe alguma composição microbiana característica da própria DP.

Em ratos transgénicos com expressão aumentada de α -sin humana criados sob condições GF ou após administração de antibióticos, foi observada uma redução da

ativação microglial, das inclusões de α -sin e ainda dos défices motores, quando comparado com o que se verificou em ratos com uma microbiota mais complexa (90).

Notavelmente, a colonização de ratos com a microbiota de indivíduos com DP, através de transplante de microbiota fecal (TMF), resultou num maior agravamento das dificuldades motoras quando comparado com os que receberam transplante de doadores saudáveis (90), reforçando a ideia de que o microbioma pode mesmo ser um fator que influencia o risco para a DP.

Para além de tudo o que foi abordado, a microbiota intestinal pode ainda afetar a DP através da interação com os agentes farmacológicos utilizados no seu tratamento: por exemplo, Kessel et al. (94) verificou que em ratos as tirosina-descarboxilases microbianas intestinais podem reduzir as concentrações plasmáticas de levodopa utilizada no tratamento da DP.

6.2.3 Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica é caracterizada pela degeneração progressiva dos neurónios motores, que se manifesta clinicamente através de fraqueza muscular, câibras, problemas de coordenação, músculos rígidos e espasmos musculares (77), que gradualmente levam à perda da capacidade de falar, engolir e, eventualmente, de respirar, o que culmina na morte (95).

Existem dois tipos de ELA: esporádica e familiar, que é provocada por alterações genéticas (77). Até aos dias de hoje, apenas 5% dos casos de ELA são considerados familiares, pelo que os restantes 95% dos casos continuam sem uma explicação válida do histórico etiológico (70). Dadas as dificuldades em encontrar os agentes causadores desta doença, várias pesquisas procuraram encontrar evidência que comprovasse que o microbioma poderá ser um fator modificador ou de prevenção da doença.

Para estudar o papel do microbioma na ELA foram utilizados ratos modelo transgénicos (SOD1G93A), que permitiram verificar que, mesmo numa fase anterior ao início da degeneração neuronal, estes ratos modelo demonstram um aumento da permeabilidade intestinal, devida a uma redução dos níveis de proteínas de oclusão ZO-1 que existem nas *tight-junctions*, e uma disrupção da BHE (96). Amostras de fezes destes ratos modelo demonstram níveis diminuídos de bactérias produtoras de butirato, como *Butyrivibrio fibrosolvens* e *Peptostreptococcus spp.* (97). Outro estudo demonstrou que a administração de butirato em ratos SOD1G93A resultou num atraso

na progressão da doença, provavelmente devido à melhoria da integridade da mucosa intestinal e ao aumento dos números de bactérias produtoras de butirato (98).

A administração de antibióticos de largo-espectro ou a criação de ratos modelo de ELA em condições GF resultaram num agravamento dos défices motores (99). Estas observações contrastam com o que se observou em ratos modelos de DA e PD.

Após análise das fezes de 6 doentes diagnosticados com ELA verificou-se que estas apresentavam baixos níveis de bactérias dos géneros *Oscillibacter*, *Anaerostipes*, e *Lachnospiraceae* (100) – produtoras de butirato (77) – e, por outro lado, níveis aumentados de bactérias do género *Dorea*, que possuem características prejudiciais para a saúde por sintetizarem etanol como produto final do metabolismo da glucose (100). Noutro estudo realizado em 20 doentes diagnosticados com ELA, foi possível observar que a razão entre o número de bactérias do filo *Bacteroidetes* e o do filo *Firmicutes* estava aumentada nos doentes com ELA em comparação com indivíduos saudáveis (101). A sequenciação metagenómica do microbioma intestinal de 37 doentes com ELA revelou algumas diferenças em comparação ao de indivíduos saudáveis, nomeadamente na abundância de *Anaerostipes hadrus*, *Bacteroidales bacterium* e *Bifidobacterium pseudocatenulatum* que estão ligeiramente aumentados, e de *Clostridium leptum* e *Escherichia coli* que estão ligeiramente diminuídos em doentes com ELA (99). Em contrapartida, noutro estudo que envolveu 25 doentes não se verificaram diferenças significativas na composição da microbiota intestinal dos doentes com ELA em comparação com indivíduos saudáveis, a não ser no número de espécies microbianas, que estava aumentado nos primeiros (102).

Os resultados contraditórios podem dever-se ao poder limitado dos estudos realizados em seres humanos, destacando-se uma necessidade de investigação sistemática e reprodutível da microbiota com coortes maiores do que aqueles com que têm sido realizados até ao momento.

6.2.4 Esclerose Múltipla

A Esclerose Múltipla é uma doença neurológica autoimune caracterizada por desmielinização e danos axonais (77), sendo também considerada uma doença neurodegenerativa devido à perda de neurónios que ocorre como consequência dos processos anteriores (103). As manifestações clínicas incluem vertigens, perda de visão, tonturas, dores, disfunção motora, défices de coordenação, fadiga, dormência, disfunções intestinais e da bexiga, depressão e défices cognitivos (77). A etiologia desta doença incurável ainda não é conhecida, mas, nos últimos anos, tem sido

investigada a possibilidade de o microbioma estar relacionado com o desenvolvimento de EM (70).

A base autoimune da EM resulta do desequilíbrio entre os mecanismos anti-inflamatórios ou reguladores e os pró-inflamatórios de células Th1 e Th17 (56). A suplementação com ácido propiónico, um SCFA, demonstrou um aumento do número de células T reguladoras (Treg) funcionalmente competentes, juntamente com uma diminuição do número de células Th1 e Th17, atrasando a progressão da EM (104).

Estudos em doentes com EM têm demonstrado baixa abundância de *Prevotella*, *Parabacteroides* e *Bacteroides*, elevada abundância de *Akkermansia* e *Dorea* e depleção de *Adlercreutzia*, *Collinsella* e *Slackia* (56). As bactérias dos géneros *Bacteroides*, *Parabacteroides* e *Prevotella* induzem a produção de SCFAs e ajudam na manutenção de células imunitárias responsáveis pela resposta anti-inflamatória (77).

O TMF já demonstrou melhorar a cognição e a estabilização de sintomas durante um período prolongado de tempo. Makkawi et al. (105) descreveu um tratamento único de uma doente de 61 anos com EM, após episódios de enterocolite, que resultou numa melhoria significativa dos sintomas da doença numa janela temporal de 10 anos. Noutro estudo, que envolveu 3 doentes com EM que receberam TMF, também se verificou remissão dos sintomas da doença, sendo que os doentes voltaram a ter, por exemplo, a capacidade de andar, durante um largo período temporal sem recaídas (106).

Tal como nas doenças anteriormente abordadas, a evidência existente para a relação entre o microbioma e a EM demonstra alguma consistência, no entanto são necessários mais estudos e ensaios clínicos para decifrar exatamente qual a relação causal entre os dois.

7 Impacto do microbioma nas doenças neurodegenerativas: Perspetivas futuras

Com os avanços tecnológicos, os conhecimentos existentes sobre o microbioma intestinal expandiram-se bastante. Através dos tópicos já abordados foi possível observar que vários estudos já demonstraram e comprovaram que existe uma relação entre o microbioma e diversas doenças neurodegenerativas. A grande maioria destes estudos foi realizada em modelos animais, pelo que o verdadeiro desafio será avaliar a relevância destes dados pré-clínicos e a sua aplicabilidade a seres humanos. Para que seja possível perceber efetivamente qual é a extensão do impacto do microbioma nestas doenças é imperativo que sejam realizados estudos em que sejam utilizadas coortes maiores e representativas das populações diagnosticadas com este tipo de doenças, utilizando métodos de investigação sistemáticos e reprodutíveis, uma vez que as várias técnicas de processamento de amostras, de sequenciação e estatísticas utilizadas em diferentes estudos dificultam a comparação direta entre os mesmos. Para além disso, a influencia de aspetos como a dieta, idade e outros fatores já mencionados também devem ser tidos em consideração.

Após a obtenção de uma explicação mais detalhada acerca desta relação será mais fácil criar e definir novas abordagens para a modulação do microbioma intestinal que promovam a prevenção destas doenças, a melhoria dos seus sintomas ou até mesmo a sua remissão.

Pesquisas futuras no âmbito das doenças neurodegenerativas devem ser direcionadas no sentido de investigar, entre outras coisas, o microbioma intestinal enquanto biomarcador para o desenvolvimento destas doenças; o efeito da suplementação com probióticos e/ou prebióticos; os efeitos da utilização de antibióticos; a pertinência da realização de TMF; ou outras substâncias que influenciem a microbiota intestinal.

De entre os vários modos de alcançar a modificação do ambiente microbiano no TGI, o TMF, apesar de se ter vindo a demonstrar como uma opção promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas, é ainda bastante controverso. O TMF a partir de dadores saudáveis para o TGI de doentes com patologias intestinais ou extraintestinais permite renovar esse ambiente e reverter alguns processos patológicos. Hoje em dia, esta técnica é já utilizada na prática clínica em situações como infeções por *Clostridium difficile*, colite ulcerativa, doença de Crohn ou obstipação refratária. Apesar de vários estudos científicos e ensaios clínicos com TMF apresentarem resultados muito satisfatórios ao demonstrarem ser possível alcançar

uma melhoria significativa dos sintomas de DA, DP ou EM, devido a questões éticas, esta técnica ainda não é utilizada na prática clínica nestas situações (56). Tendo em consideração os resultados promissores desta técnica, será expectável que a mesma seja cada vez mais explorada e aplicada na prática clínica. Com esse objetivo, estão a decorrer alguns ensaios clínicos onde o TMF é aplicado em doentes diagnosticados com DP e EM. Ainda que o tamanho das amostras seja relativamente reduzido, o desenvolvimento dos mesmos demonstra o interesse emergente nesta técnica. Alguns destes ensaios clínicos são: *MS-BIOME*, com 30 participantes (NCT03594487) (107); *Oral FMT in Subjects with Multiple Sclerosis*, com 15 participantes (NCT04096443) (108); *A Trial of Fecal Microbiome Transplantation in Parkinson's Disease Patients*, com 48 participantes (NCT04854291) (109); *Study of the Fecal Microbiome in Patients With Parkinson's Disease*, com 12 participantes (NCT03671785) (110). Nestes ensaios é estudada a capacidade desta técnica promover uma melhoria dos sintomas da doença ou, até mesmo, de alcançar a sua remissão.

Para além do TMF e de alguns fármacos convencionais, como os antibióticos, começam a aparecer novas maneiras de manipular a microbiota intestinal. O oligomanato de sódio (GV-971), um oligossacárido derivado de algas, demonstrou ter a capacidade de reverter de forma evidente a disbiose intestinal e regular a produção anormal de metabolitos como a fenilalanina e a isoleucina, o que resultou na inibição da neuroinflamação provocada pelas células Th1, o que por sua vez influencia a progressão da DA (56). De notar ainda que este oligossacárido tem como alvo várias sub-regiões dos péptidos β A, tendo a capacidade de inibir a sua aglomeração e destruir os agregados já formados transformando-os em compostos não tóxicos (111). Em agosto de 2020 foi iniciado o recrutamento de participantes, entre os 50 e os 85 anos diagnosticados com DA leve a moderada, para os ensaios clínicos de fase 3 - *GREEN MEMORY* (112), que serão desenvolvidos nos Estados Unidos da América e no Canadá. Apesar de à data o processo de recrutamento ainda não estar concluído, estima-se que contará com a cooperação de cerca de 2046 participantes e que estará finalizado no final do ano 2026.

O futuro, em conjunto com o avanço da tecnologia, irá permitir não só descodificar o modo exato como microbioma, intestino e cérebro interagem, mas também, com base nesse conhecimento, criar novas abordagens terapêuticas para as doenças neurodegenerativas.

8 Conclusão

A influência do microbioma intestinal em processos fisiológicos, nomeadamente, metabólicos, imunológicos ou inflamatórios, necessários para a manutenção da homeostase, torna-o fundamental para o estabelecimento do estado de saúde do hospedeiro. Esta ação do microbioma não se limita ao intestino estendendo-se a vários outros órgãos, inclusive o cérebro, onde apresenta um papel ativo no neurodesenvolvimento, na neuroprotecção e, em casos de disbiose, na neurodegeneração.

É incontestável que as doenças neurodegenerativas estão de alguma forma relacionadas com a idade, no entanto não sendo o envelhecimento por si só causador deste tipo de doenças, terão de existir outros fatores que, associados a este, resultem no desenvolvimento de processos neurodegenerativos provocados, normalmente, por danos oxidativos e pela neuroinflamação. Assim, surgiu um interesse global em relacionar o microbioma com a ocorrência destes processos, o que levou a um aumento exponencial de estudos nesta área que evidenciam uma conexão perceptível entre o microbioma e a neurodegeneração ao verificar-se um agravamento de sintomas após TMF de doentes em comparação com doentes saudáveis, a remissão de sintomas após administração de probióticos e ainda as diferenças na composição do microbioma observadas em cada uma das doenças. Mais ainda do que as espécies bacterianas que compõem a microbiota, é bastante relevante a capacidade que cada uma delas tem para produzir determinados metabolitos, como os antioxidantes, SCFAs, neurotransmissores ou citocinas, tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias, uma vez que estes compostos, consoante os seus níveis de abundância, são determinantes para a modulação de um ambiente com maior ou menor carácter inflamatório e oxidativo, sendo este, respetivamente, mais ou menos propício para a progressão de processos neurodegenerativos.

Apesar de tudo, é importante ter cautela e evitar uma interpretação desadequada dos dados numa fase em que os estudos são ainda um pouco contraditórios, são realizados na sua maioria em modelos animais e necessitam de superar alguns desafios, relacionados com a uniformidade, reprodutibilidade e robustez dos métodos utilizados.

Com base nos dados recolhidos até à data, é expectável que a modulação do microbioma se torne um método recorrentemente utilizado na profilaxia e terapêutica das diferentes doenças neurodegenerativas. Devido à complexidade, individualidade e variabilidade do microbioma provocada por vários fatores externos desde a infância

até idades mais avançadas, poderá ser necessário adotar estratégias terapêuticas personalizadas. Estas estratégias terapêuticas podem passar pela aplicação de novas abordagens, como o TMF, que cada vez mais é alvo de ensaios clínicos, a administração de probióticos, ou até mesmo por simples ajustes na dieta que promovam o desenvolvimento de um microbioma intestinal saudável.

Referências Bibliográficas

1. Cryan JF, O’Riordan KJ, Sandhu K, Peterson V, Dinan TG. The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2020;19(2):179–94.
2. Dinan TG, Cryan JF. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017;46(1):77–89.
3. Westfall S, Lomis N, Kahouli I, Dia SY, Singh SP, Prakash S. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(20):3769–87.
4. Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med.* 2018;32(1):9–25.
5. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464:59–65.
6. Cryan JF, O’riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu K V., Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev.* 2019;99(4):1877–2013.
7. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;69(1):69-75.
8. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms.* 2019;7(14).
9. Konturek PC, Haziri D, Brzozowski T, Hess T, Heyman S, Kwiecien S, et al. Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases. *J Physiol Pharmacol.* 2015;66(4):483–91.
10. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: Current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res.* 2012;160(4):246–57.
11. Rajilić-Stojanović M, Smidt H, De Vos WM. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol.* 2007;9(9):2125–36.
12. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473:174–80.
13. Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. *PLoS One.* 2013;8(6): e66986.
14. Neu J. The microbiome during pregnancy and early postnatal life. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016;21(6):373–9.
15. Voreades N, Kozil A, Weir TL. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol.* 2014;5(495).
16. Le Hurou-Luron I, Blat S, Boudry G. Breast- v. formula-feeding: Impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev.* 2010;23(1):23–36.
17. Cresci GA, Bawden E. Gut microbiome: What we do and don’t know. *Nutr Clin Pract.* 2015;30(6):734–46.
18. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg

- C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut*. 2014;63(4):559–66.
19. Sandhu K V., Sherwin E, Schellekens H, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry. *Transl Res*. 2017;179:223–44.
 20. Kerperien J, Schouten B, Boehm G, Willemsen L, Garssen J, Knippels L, et al. Development of the Immune System - Early Nutrition and Consequences for Later Life. *Recent Adv Immunol to Target Cancer, Inflamm Infect*. 2012; p.326 ISBN: 978-953-51-0592-3.
 21. German J, Freeman S, Lebrilla C, Mills D. Human milk oligosaccharides: Evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. *Nestle Nutr Work Ser Pediatr Progr*. 2008;62:205–22.
 22. Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*. 2011;17(6):478–82.
 23. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006;118(2):511–21.
 24. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486:222–7.
 25. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2(104).
 26. Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr*. 2014;111(3):387–402.
 27. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*. 2010;5(5).
 28. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, De Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(Supplement 1):4586–91.
 29. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. 2012;488:178–84.
 30. Zwieler J, Liszt K, Handschur M, Lassi C, Lapin A, Haslberger AG. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly. *Exp Gerontol*. 2009;44(6–7):440–6.
 31. Odumaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):1–12.
 32. Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol*. 2007;102(5):1178–86.
 33. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*.

- 2011;334(6052):105–8.
34. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505:559–63.
 35. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*. 2011;5(2):220–30.
 36. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14691–6.
 37. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013;500:585–8.
 38. Zimmer J, Lange B, Frick JS, Sauer H, Zimmermann K, Schwartz A, et al. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr*. 2012;66(1):53–60.
 39. Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjolund-Karlsson M, Janet K, Engstrand L. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS One*. 2010;5(3).
 40. Rashid M, Zaura E, Buijs MJ, Keijser B, Crielaard W, Nord CE, et al. Determining the Long-term Effect of Antibiotic Administration on the Human Normal Intestinal Microbiota Using Culture and Pyrosequencing Methods. *Clin Infect Dis*. 2015;60(Suppl 2):77–84.
 41. Stewardson AJ, Gaia N, François P, Delémont C, Tejada BM De, Schrenzel J. Collateral damage from oral ciprofloxacin versus nitrofurantoin in outpatients with urinary tract infections: a culture-free analysis of gut microbiota. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(4).
 42. Macfarlane S. Antibiotic treatments and microbes in the gut. *Environ Microbiol*. 2014;16:919–24.
 43. Izumi T, Battaglia T, Ruiz V, Perez GIP. Gut Microbiome and Antibiotics. *Arch Med Res*. 2017;48(8):727–34.
 44. Jernberg C, Lo S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*. 2010;156(11):3216–23.
 45. Korpela K, Salonen A, Virta LJ, Kekkonen RA, Forslund K, Bork P, et al. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat Commun*. 2016;7(10410).
 46. Vrieze A, Out C, Fuentes S, Jonker L, Reuling I, Kootte RS, et al. Vancomycin decreases insulin sensitivity and is associated with alterations in intestinal microbiota and bile acid composition in obese subjects with metabolic syndrome. *J Hepatol*. 2013;60(4):824–31.
 47. Karl JP, Hatch AM, Arcidiacono SM, Pearce SC, Pantoja-feliciano IG, Doherty LA, et al. Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota. *Front Microbiol*. 2018;9(2013).
 48. Murakami T, Kamada K, Mizushima K, Higashimura Y, Katada K, Uchiyama K, et al. Changes in Intestinal Motility and Gut Microbiota Composition in a Rat Stress Model. *Digestion*. 2017;95:55–60.

49. Molina-torres G, Rodriguez-arrastia M, Roman P, Sanchez-labraca N, Cardona D. Stress and the gut microbiota-brain axis. *Behav Pharmacol.* 2019;30:187–200.
50. Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10:735–42.
51. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015;21(29):8787–803.
52. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017;474:1823–36.
53. Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Wargo JA. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. *Cancer Cell.* 2018;33(4):570–80.
54. Elsen LWJ Van Den, Poyntz HC, Weyrich LS, Young W, Forbes-Blom EE. Embracing the gut microbiota: the new frontier for inflammatory and infectious diseases. 2017;6(1):e125.
55. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(3):473–93.
56. Chen Z, Maqbool J, Sajid F, Hussain G, Sun T. Human gut microbiota and its association with pathogenesis and treatments of neurodegenerative diseases. *Microb Pathog.* 2021;150.
57. Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal Pathways for Microbiome-Brain-Gut Axis Communication. *Microb Endocrinol Microbiota-Gut-Brain Axis Heal Dis Adv Exp Med Biol.* 2014;817:115–33.
58. Goehler LE, Gaykema RPA, Opitz N, Reddaway R, Badr N, Lyte M. Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: Early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain Behav Immun.* 2005;19(4):334–44.
59. Wang X, Wang BR, Zhang XJ, Xu Z, Ding YQ, Ju G. Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. *World J Gastroenterol.* 2002;8(3):540–5.
60. Bravo JA, Forsythe P, Chew M V., Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(38):16050–5.
61. Haq RA, Schlachetzki JCM, Glass CK, Mazmanian SK. Microbiome – microglia connections via the gut – brain axis. *J Exp Med.* 2018;216:41–59.
62. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience.* 2010;170(4):1179–88.
63. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(8):461–78.
64. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol.* 2020;11(25).
65. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry.* 2013;18(6):666–73.

66. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*. 2004;558(1):263–75.
67. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci*. 2017;20(2):145–55.
68. Erny D, Angelis ALH de, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, Eyal D, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. 2015;18(7):965–77.
69. Dinan TG, Cryan JF. Brain-gut-microbiota axis and mental health. *Psychosom Med*. 2017;79(9):920–6.
70. Sasmita AO. Modification of the gut microbiome to combat neurodegeneration. *Rev Neurosci*. 2019;30(8):795–805.
71. Konjevod M, Perkovic MN, Jorge S, Strac S, Barbas C, Rojo D. Metabolomics analysis of microbiota-gut-brain axis in neurodegenerative and psychiatric diseases. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;194.
72. Gabuzda D, Yankner BA. Inflammation links ageing to the brain. *Nature*. 2013;497:197–8.
73. Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *Journals Gerontol Ser A*. 2014;69:S4–9.
74. Herrero MT, Morelli M. Progress in Neurobiology Multiple mechanisms of neurodegeneration and progression. *Prog Neurobiol*. 2017;155:1.
75. Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol*. 2017;595(2):489–503.
76. Goldman JG, Postuma R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(4):434–41.
77. Sarkar SR, Banerjee S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *J Neuroimmunol*. 2019;328:98–104.
78. Sochocka M, Ł KD-, Diniz BS, Kurpas D, Brzozowska E, Pathogenesis IA. The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease - a Critical Review. *Mol Neurobiol*. 2018;56:1841–1851.
79. Goyal D, Ali SA, Singh RK. Emerging role of gut microbiota in modulation of neuroinflammation and neurodegeneration with emphasis on Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2020;106.
80. Lin L, Zheng LJ, Zhang LJ. Neuroinflammation, Gut Microbiome, and Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2018;55:8243–8250.
81. Minter MR, Zhang C, Leone V, Ringus DL, Zhang X, Chang EB, et al. Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Nat Publ Gr*. 2016;6(30028).
82. Harach T, Marungru N, Duthilleul N, Cheatham V, Coy KDM, Frisoni G. Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci Rep*. 2017;7(41802).
83. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2017;7(1).
84. Zhuang Z, Shen L, Li W, Fu X, Zeng F, Gui L, et al. Gut Microbiome is Altered

- in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2018;63(4):1337–46.
85. Cattaneo A, Cattane N, Galluzzi S, Lopizzo N, Festari C, Ferrari C, et al. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging.* 2016;49:60-68
 86. Akbari E, Asemi Z, Kakhaki RD, Bahmani F. Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial. *Front Aging Neurosci.* 2016;8(256).
 87. Parashar A, Udayabanu M. Gut microbiota: Implications in Parkinson's disease. *Park Relat Disord.* 2017;38:1–7.
 88. Svensson E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, Sørensen HT. Vagotomy and Subsequent Risk of Parkinson's Disease. *Ann Neurol.* 2015;78(4):522–9.
 89. Fang P, Kazmi SA, Jameson KG, Hsiao EY. The Microbiome as a Modifier of Neurodegenerative Disease Risk. *Cell Host Microbe.* 2020;28(2):201–22.
 90. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Wittung-stafshede P, Knight R, Mazmanian SK, et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell.* 2016;167(6):1469–80.
 91. Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, Koskinen K, Paulin L. Gut Microbiota Are Related to Parkinson's Disease and Clinical Phenotype. *Mov Disord.* 2014;30(3):350–8.
 92. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One.* 2011;6(12).
 93. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, et al. Colonic Bacterial Composition in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2015;30(10):1351–60.
 94. Kessel SP Van, Frye AK, El-gendy AO, Dijk G Van, Aidy S El, Castejon M, et al. Gut bacterial tyrosine decarboxylases restrict levels of levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Nat Commun.* 2019;10(310).
 95. Fournier CN, Houser M, Tansey MG, Glass JD, Hertzberg VS. The gut microbiome and neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis? Emerging clinical evidence. *Neurobiol Dis.* 2020;135(104300).
 96. Fang X. Potential role of gut microbiota and tissue barriers in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci.* 2015;126(9):771–6.
 97. Wu S, Yi J, Zhang Y, Zhou J, Sun J. Leaky intestine and impaired microbiome in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. 2015;3(4): e12356.
 98. Zhang Y, Wu S, Yi J, Xia Y. Target Intestinal Microbiota to Alleviate Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clin Ther.* 2017;39(2):322–36.
 99. Blacher E, Bashiardes S, Shapiro H, Rothschild D, Mor U, Dori-bachash M, et al. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature.* 2019;572:474–80.
 100. Fang X, Wang X, Yang S, Meng F, Wang X, Wei H. Evaluation of the Microbial Diversity in Amyotrophic Lateral Sclerosis Using High-Throughput Sequencing.

- Front Microbiol. 2016;7(1479).
101. Zeng Q, Shen J, Chen K, Zhou J, Liao Q, Lu K, et al. The alteration of gut microbiome and metabolism in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Sci Rep*. 2020;10(12998).
 102. Brenner D, Hiergeist A, Adis C, Mayer B, Gessner A, Ludolph AC, et al. The fecal microbiome of ALS patients. *Neurobiol Aging*. 2017;61:132–7.
 103. Alonso R, Fernández-fernández AM, Pisa D. Multiple sclerosis and mixed microbial infections. Direct identification of fungi and bacteria in nervous tissue. *Neurobiol Dis*. 2018;117:42–61.
 104. Duscha A, Gisevius B, Hirschberg S, Linker RA, Gold R, Haghikia A, et al. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell*. 2020;180(6):1067–80.
 105. Makkawi S, Camara-lemarroy C, Metz L. Fecal microbiota transplantation associated with 10 years of stability in a patient with SPMS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2018;5(4): e459.
 106. Borody T, Leis S, Campbell J, Torres M, Nowak A. Fecal Microbiota Transplantation (FMT) in Multiple Sclerosis (MS). *Am J Gastroenterol*. 2011;106(Suppl 2):352.
 107. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. Identifier: NCT03594487, Fecal Microbiota Transplantation (FMT) of FMP30 in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (MS-BIOME) [cited 2021 May 21]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03594487>
 108. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. Identifier: NCT04096443, Oral FMT (Fecal Microbial Transplant) in Subjects With Multiple Sclerosis [cited 2021 May 21]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04096443>
 109. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. Identifier: NCT04854291, A Trial of Fecal Microbiome Transplantation in Parkinson's Disease Patients. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04854291>
 110. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. Identifier: NCT03671785, Study of the Fecal Microbiome in Patients With Parkinson's Disease [cited 2021 May 21]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03671785>
 111. Wang T, Kuang W, Chen W, Xu W, Zhang L, Li Y, et al. A phase II randomized trial of sodium oligomannate in Alzheimer ' s dementia. *Alzheimers Res Ther*. 2020;12(110).
 112. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. Identifier: NCT04520412, A Study of Sodium Oligomannate (GV-971) in Participants With Mild to Moderate Alzheimer's Disease (GREEN MEMORY); 2021 [cited 2021 May 21]. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04520412>