



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IMPACTO DA MICROBIOTA INTESTINAL NA SAÚDE MENTAL

Trabalho submetido por
Joana Almeida Vilão Raposo Landeiro
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IMPACTO DA MICROBIOTA INTESTINAL NA SAÚDE MENTAL

Trabalho submetido por
Joana Almeida Vilão Raposo Landeiro
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Madalena Oom

novembro de 2016

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à Prof^ª. Doutora Maria Madalena Oom, uma vez que foi quem me apresentou este tema e me abriu as portas para fazer as pesquisas que quisesse acerca do eixo intestino-cérebro, construindo o meu trabalho como achasse melhor. Agradeço toda a ajuda, as preciosas correções e sugestões e sobretudo a paciência para responder a todas as minhas dúvidas.

Em segundo lugar tenho de agradecer aos meus pais por me terem dado a oportunidade de continuar os meus estudos dando-me total liberdade para escolher a área que mais me cativasse. E um obrigado especial à minha mãe por me ter dado um pequeno empurrão em direção às Ciências Farmacêuticas, numa altura em que eu não sabia o que escolher! Mas mais importante: agradeço todos os “vais ver que és capaz! Força! Está quase!” quando o cansaço e a pressão pareciam demasiado pesados e o fim desta jornada estava longe de ser atingido.

Um muito obrigado ao Tiago, que embora sendo o membro mais recente da minha “claque motivacional”, esteve presente em todos os momentos para me dar energia, para me fazer companhia quando tudo o que eu precisava era de ir espairecer e arejar as ideias e por ser capaz de me acalmar quando começo a sofrer por antecipação. Mas especialmente, um enorme agradecimento pela muita ajuda técnica que me deu quando as tecnologias decidiam não querer colaborar comigo!

E neste seguimento: um bem-haja à minha colega Vera Figueiredo que teve uma paciência enorme para me salvar de uma crise “tecnológica” inesperada! E claro, por me acompanhar desde o 1º ano em muitas aventuras e desventuras e por se ter tornado a condutora de serviço para a faculdade, animando as viagens com muita música de qualidade! E obrigado aos rapazes do grupo Ricardo Sobral, Miguel Belchior e Miguel Borges pelos muitos momentos passados na faculdade, os jantares e os cafés.

E agora para as resistentes “fixes” Patrícia Garcia, Sara Guedes, Margarida Matos, Mariana Jesus, Rita Marques, Cristina Carrasco e Mariana Lucas: mil obrigados pelas parvoeiras, por não se assustarem com as minhas maluquices, pelas noitadas de estudo, pelas respostas às questões existenciais da Joana, por...bom, por tudo! O espaço na folha e as palavras não são suficientes para tudo o que vos gostaria de dizer portanto terei de finalizar os meus agradecimentos por aqui, deixando-vos apenas com um até já!

Resumo

A microbiota intestinal consiste no conjunto de microrganismos residentes no intestino humano e que é responsável pela execução de diversas funções, sendo essencial para a manutenção da homeostase. Esta encontra-se em comunicação com o sistema nervoso central através do eixo intestino-cérebro, sendo esta comunicação bidirecional. Vários estudos têm revelado que a microbiota intestinal influencia o normal funcionamento do cérebro e o comportamento, através da via neural, endócrina ou imunitária. Desta forma, a comunidade bacteriana comensal presente no intestino é responsável por regular as respostas ao *stress*, tendo-se demonstrado que modificações na composição da microbiota se encontram associadas ao desenvolvimento de ansiedade e depressão. Também em doenças como o autismo, a esquizofrenia, o Parkinson ou o Alzheimer, se observam alterações a nível da comunidade bacteriana intestinal. A modulação da microbiota intestinal poderá, então, ser uma estratégia para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento de doenças mentais.

Palavras-chave: microbiota intestinal, cérebro, eixo intestino-cérebro, saúde mental

Abstract

The gut microbiota consists of the collection of microorganisms residing in the human intestine and that are responsible for the execution of several functions, being essential for the maintenance of homeostasis. This is in communication with the central nervous system through the gut-brain axis, being a bidirectional communication. Several studies have revealed that the gut microbiota influences normal brain function and behavior through the neural, endocrine and immune pathways. Thus the commensal bacterial community present in the intestine is responsible for regulating stress responses and it has been demonstrated that changes in the composition of the microbiota are associated with the development of anxiety and depression. There are also changes in the intestinal bacterial community in diseases such as autism, schizophrenia, Parkinson's or Alzheimer's. Modulation of the gut microbiota may be a strategy for the development of new therapeutic options for the treatment of mental illness.

Keywords: gut microbiota, brain, gut-brain axis, mental health

Índice Geral

Resumo	1
Abstract.....	3
Índice de Figuras	7
Lista de Abreviaturas.....	9
Introdução.....	11
1. A microbiota.....	13
1.1 Desenvolvimento do microbioma intestinal	15
1.2 Funções da microbiota intestinal	18
1.3 Como se estuda a microbiota	19
2. Eixo Intestino-Cérebro	23
2.1 Mecanismos de ação do eixo intestino-cérebro	24
2.2 Como se estuda o papel da microbiota na saúde e doença	30
2.3 Eixo intestino-cérebro e doença mental.....	35
2.3.1 Resposta ao <i>stress</i> e ansiedade	37
2.3.2 Capacidade cognitiva.....	43
2.3.3 Depressão	45
2.3.4 Autismo	47
2.3.5 Esquizofrenia.....	50
2.3.6 Alzheimer	52
2.3.7 Parkinson	55
2.4 Psicobióticos	57
Conclusão	59
Bibliografia.....	61

Índice de Figuras

Figura 1 - Desenvolvimento do microbioma.....	15
Figura 2 – Como se estuda o microbiom.....	20
Figura 3 - Mecanismos envolvidos na comunicação bidirecional do eixo intestino-cérebro	29
Figura 4 - Abordagens experimentais para estudo da microbiota e eixo intestino-cérebro	30
Figura 5 - Eixo microbiota-intestino-cérebro na saúde e doença.....	35
Figura 6 – Desenvolvimento neurológico e desenvolvimento da microbiota ao longo da vida e sua relação com aparecimento de doenças mentais	36
Figura 7 - Possíveis fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de autismo	47

Lista de Abreviaturas

16S rRNA – RNA ribossomal 16s

α -syn – Alfa-sinucleína

ω -3 PUFA – Ácido gordo polinsaturado ómega 3

ACTH - Hormona adrenocorticotrófica

BDNF – “Brain-derived neurotrophic factor” / Fator neurotrófico derivado do cérebro

mRNA – RNA mensageiro

CREB – “cAMP response element binding protein”/ proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico

CRF - “Corticotropin releasing factor”

DHA – Ácido docosahexaenóico

EPA – Ácido eicosapentaenóico

GABA - Ácido gama-aminobutírico

HPA - “Hypothalamic pituitary adrenal axis”/ Eixo hipotálamo-hipófise

IL-1 e IL-6 – Interleucina-1 e Interleucina-6

IBS – “Irritable Bowel Syndrome”/ Síndrome do intestino irritável

LPS – Lipopolissacarídeos

NMDA – N-metil D-aspartato

SCFA – “Short chain fatty acids” / Ácidos gordos de cadeia curta

SNC – Sistema Nervoso Central

SNE – Sistema Nervoso Entérico

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Introdução

A microbiota intestinal desempenha diversas funções no organismo humano sendo um participante importante na comunicação entre o intestino e o cérebro. Esta comunicação é bidirecional sendo realizada ao longo do cada vez mais falado eixo intestino-cérebro (Cryan & Dinan, 2012). Alterações na comunicação ao longo deste eixo e sobretudo, modificações na composição da microbiota intestinal têm sido identificadas em doenças do foro mental, como depressão, ansiedade, Alzheimer, entre outras (Yarandi, Peterson, Treisman, Moran, & Pasricha, 2016). Torna-se então necessário responder à pergunta de como poderá a microbiota estar envolvido na patogénese destas doenças: será uma causa ou um efeito? (Mu, Yang, & Zhu, 2016). Outra questão importante que se coloca é se será viável utilizar esta mesma microbiota e a sua modulação, como opção terapêutica para estas patologias mentais (O'Mahony, Clarke, Borre, Dinan, & Cryan, 2015).

Esta monografia tem como objetivo compilar a informação existente acerca da microbiota intestinal e de que forma este se encontra relacionado com a saúde mental. Numa primeira parte será abordado a microbiota e numa segunda parte serão desenvolvidos temas relacionados com o eixo intestino-cérebro.

No primeiro capítulo é definido a microbiota intestinal e que espécies bacterianas se encontram presentes no mesmo, referindo-se também como ocorre o desenvolvimento da microbiota e quais as funções desta comunidade bacteriana intestinal no organismo humano. É também feito um pequeno resumo acerca dos métodos utilizados para o estudo da microbiota.

O segundo capítulo tem como objetivo explicar no que consiste o eixo intestino-cérebro, quais os mecanismos envolvidos na comunicação entre este eixo e a microbiota intestinal e como se procede o estudo do seu impacto na saúde e na doença. Por último, são abordadas diferentes doenças do foro mental, sendo apresentados diversos estudos que demonstram o papel da microbiota intestinal na patogénese destas doenças, e de que forma este também poderá ser responsável pela criação de novas abordagens terapêuticas.

A escolha deste tema reside no facto de ser uma temática bastante atual e sobre a qual cada vez se fala mais. Por esse motivo, pensei que seria uma mais valia conhecer

um pouco melhor o conceito de eixo intestino-cérebro e de que forma este pode estar envolvido na saúde mental, uma vez que se trata, na minha opinião, de um tema bastante interessante e sobre o qual ainda muito se ouvirá no futuro.

Para a elaboração desta revisão foi realizada uma pesquisa bibliográfica com recurso às bases de dados PubMed e B-on, tendo-se procurado as palavras-chave “gut microbiota”, “microbiome”, “gut-brain axis” e mais tarde foram procurados conceitos mais complexos como “gut microbiota/mental health”, “gut microbiota/anxiety” ou “gut-brain axis/anxiety” em relação às diversas doenças. Os artigos recolhidos preferencialmente foram os mais recentes mas obtiveram-se muitos resultados sobretudo a partir de 2010, sendo a seleção feita primeiramente pela leitura do abstract.

1. A Microbiota

As bactérias encontram-se espalhadas por todo o planeta terra, podendo ser encontradas nos mais diversos ambientes, desde as florestas da Amazônia, aos desertos com temperaturas elevadas, nos glaciares da Antártica e até nas profundezas dos oceanos (Montiel-Castro, González-Cervantes, Bravo-Ruiseco, & Pacheco-López, 2013). Também o organismo humano se encontra colonizado por bactérias e outros microrganismos.

O corpo humano é constituído por um complexo ecossistema, onde cerca de 90% das células não são de origem humana mas sim de origem microbiana, sendo que estas, aproximadamente, 100 triliões de células juntas correspondem a quase 1-2 kg num indivíduo adulto (Forsythe & Kunze, 2013; Turnbaugh et al., 2007). A área mais colonizada do organismo humano é o trato gastrointestinal onde se podem encontrar 10^{13} - 10^{14} microrganismos, sobretudo ao nível do cólon (Gill et al., 2006; Ley, Peterson, & Gordon, 2006). A maioria dos artigos publicados considera que isto significa que os microrganismos presentes no trato gastrointestinal são 10 vezes mais que o número de células humanas no corpo e possuem 150 vezes tantos genes como o genoma humano (Gill et al., 2006; Ley et al., 2006). Esta ideia tem persistido até ao presente, sendo referida por inúmeras vezes nos diferentes trabalhos publicados desde que o microbiologista Thomas Luckey estimou o rácio de 10:1 em 1972 (Luckey, 1972). No entanto, recentemente Judah Rosner (2014) questionou esta hipótese ao salientar que não existem muitos estudos que estimem, de fato, o número de células humanas e microbianas no organismo humano. Ron Sender, Shai Fuchs e Ron Milo (2016) recalcularam estes números ao procederem a uma revisão dos dados experimentais mais recentes e concluíram que o “homem referência”, definido como tendo entre 20-30 anos, 70 kg de peso e 1,70 m de altura (Snyder et al., 1975), possui cerca de $3,9 \times 10^{13}$ células bacterianas e $3,0 \times 10^{13}$ células humanas (Sender, Fuchs, & Milo, 2016). Assim concluíram que o rácio será de 1,3:1 em vez de 10:1, de tal forma que após cada defecação o número de células humanas ainda se aproxima mais do número de células bacterianas (Sender et al., 2016).

Ao conjunto de microrganismos que habitam um determinado ambiente, como por exemplo neste caso o intestino humano, dá-se o nome de microbiota enquanto ao conjunto de genes e genomas presentes dentro da microbiota se dá o nome de

microbioma (Eloe-Fadrosch & Rasko, 2013). Uma vez que a maioria dos estudos recorre à identificação dos genes presentes na microbiota para o estudar, será utilizada a terminologia microbioma em situações que se refiram aos estudos em si enquanto a terminologia microbiota será utilizada quando forem referidas as ações das bactérias.

O número de espécies presentes na microbiota intestinal varia bastante, mas considera-se que no intestino de um adulto existem mais de 1,000 espécies (Qin et al., 2010) e mais de 7,000 estirpes (Ley et al., 2006). As bactérias, que predominam neste ambiente, são sobretudo anaeróbias e pertencem ao filo dos Firmicutes e ao filo dos Bacteroidetes, mas também se podem encontrar bactérias dos filios das Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobacteria ainda que em muito menor abundância (Eckburg et al., 2005). Embora a composição bacteriana da microbiota varie entre indivíduos, foi proposto que a microbiota intestinal de todos os humanos se pode classificar como um de três enterotipos principais, sendo cada um destes caracterizado por níveis elevados de um único género: *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. ou *Ruminococcus* spp. (Arumugam et al., 2011). Mas o intestino humano também é colonizado por fungos, protozoários, archaea (Bäckhed, Ley, Sonnenburg, Peterson, & Gordon, 2005) e vírus (Reyes et al., 2010) embora em menor quantidade.

1.1 Desenvolvimento do microbioma intestinal

O intestino do recém-nascido é considerado estéril aquando do nascimento, embora estudos recentes acerca do microbioma da placenta e do útero desafiem esta suposição (Aagaard et al., 2015; Funkhouser & Bordenstein, 2013). No entanto, considera-se que o primeiro microbioma adquirido pelo recém-nascido depende do modo como nasce, uma vez que o microbioma dos bebés nascidos por parto vaginal se assemelha ao microbioma vaginal e intestinal da mãe, enquanto os bebés nascidos por cesariana possuem um microbioma semelhante ao que geralmente se encontra na pele ou no ambiente hospitalar (Biasucci et al., 2010; Dominguez-Bello et al., 2010). A cronologia da aquisição deste primeiro microbioma encontra-se esquematizada na figura 1.

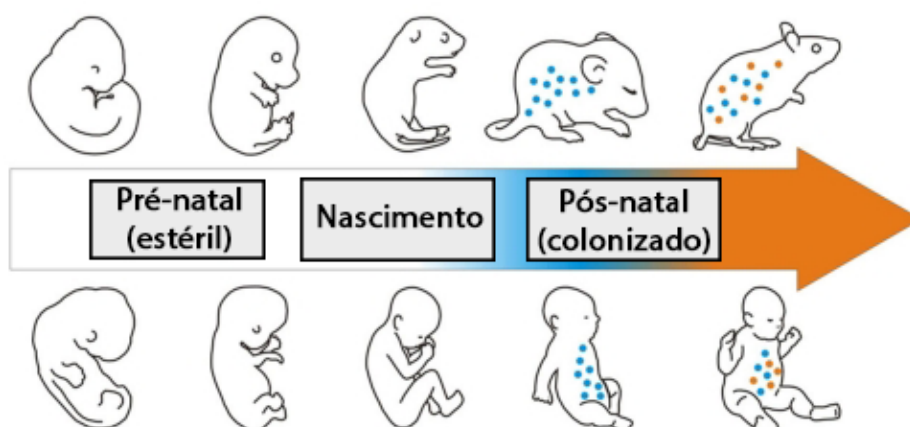


Figura 1 - Desenvolvimento do microbioma (adaptado de Grenham, Clarke, Cryan, & Dinan, 2011)

Além do tipo de parto pensa-se que a idade gestacional poderá contribuir para a composição microbiana do organismo. Num estudo onde foram analisadas amostras de fezes de 10 crianças pré-termo, verificou-se que o seu microbioma não possui *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* que correspondem a dois dos principais géneros de bactérias presentes no intestino de recém-nascidos de termo (Barrett et al., 2013).

Durante os primeiros dias de vida o microbioma intestinal da criança é pouco diversificado e bastante instável, tornando-se progressivamente mais estável com a introdução do leite materno ou artificial. A população microbiana é bastante diferente dependendo do tipo de dieta – o microbioma das crianças alimentadas com leite

materno é menos diversificado contudo mais estável que o das crianças alimentadas exclusivamente com leite artificial (Fan, Huo, Li, Yang, & Duan, 2014; Roger, Costabile, Holland, Hoyles, & McCartney, 2010; Schwartz et al., 2012).

O microbioma volta a sofrer nova alteração entre o primeiro e segundo ano de vida, devido ao desmame e consequente introdução de comida sólida (Bergström et al., 2014; De Filippo et al., 2010; Fallani et al., 2011). De facto observou-se que a amamentação, independentemente da sua duração, fornece às crianças um conjunto específico de bactérias, único e bastante distinto do encontrado em crianças que já ingerem comida sólida (De Filippo et al., 2010). No mesmo estudo também se verificou que a introdução desta alimentação tem um papel bem mais notável que outros fatores ambientais ou fisiológicos, contribuindo grandemente para a formação do microbioma a longo prazo (De Filippo et al., 2010). É entre os 18 e os 36 meses de idade que o microbioma intestinal sofre a sua última grande alteração, sendo esta gradual ao longo do tempo por influência da dieta sólida mais variada, começando-se a assemelhar aos poucos ao microbioma estável do adulto (Bergström et al., 2014; De Filippo et al., 2010; Koenig et al., 2011). Quanto mais cedo se introduz a comida sólida na dieta, mais cedo este microbioma atinge a estabilidade (Bergström et al., 2014). Apesar de se assumir que o microbioma intestinal da criança se assemelha ao do adulto, alguns estudos demonstraram que o microbioma intestinal durante a adolescência ainda possui diferenças significativas quando comparado com a flora microbiana do adulto, sobretudo ao nível das quantidades em que se podem encontrar os diferentes géneros bacterianos (Agans et al., 2011; Ringel-Kulka et al., 2013).

Existem ainda outros fatores que influenciam a composição do microbioma em desenvolvimento de uma criança, tal como fatores geográficos e culturais, utilização de antibióticos e consumo de probióticos e prebióticos (Persaud et al., 2014; Saavedra, 2007; Yatsunenko et al., 2012),

Com a chegada à idade adulta o microbioma intestinal torna-se característico de cada indivíduo, mantendo-se relativamente estável com o tempo - as maiores alterações surgem na abundância das bactérias presentes no intestino (Rajilic-Stojanovic, Heilig, Tims, Zoetendal, & De Vos, 2013). Cada indivíduo parece possuir um microbioma núcleo (Rajilic-Stojanovic et al., 2013; Turnbaugh & Gordon, 2009), que é estável tanto por períodos curtos de tempo, inferiores a 1 ano, como por períodos mais longos,

superiores a 10 anos (Rajilic-Stojanovic et al., 2013). Quando o organismo é exposto a certos estímulos externos capazes de causar alterações, como a utilização de antibióticos, *stress* ou viagens, o microbioma consegue resistir, mantendo ou restaurando o seu núcleo microbiano estável podendo, contudo, sofrer flutuações quantitativas (Rajilic-Stojanovic et al., 2013). Modificações nesta capacidade funcional de recuperação e consequente alteração permanente do microbioma estão associadas, por exemplo, a distúrbios metabólicos como a obesidade (Turnbaugh et al., 2009; Turnbaugh & Gordon, 2009). É ainda importante referir que o microbioma intestinal embora sendo bastante estável, apresenta plasticidade durante a idade adulta sendo influenciado por exemplo, por fatores nutricionais, apresentando diferenças na sua composição após a introdução de mudanças na dieta (David et al., 2014). A capacidade de recuperação que se observa no microbioma intestinal resulta do facto de este ser bastante resiliente no que toca a estímulos presentes por curtos períodos de tempo (Lozupone, Stombaugh, Gordon, Jansson, & Knight, 2012; Sonnenburg et al., 2016).

À medida que envelhece, a diversidade e estabilidade do microbioma intestinal diminui de acordo com o estado de saúde do indivíduo (Claesson et al., 2011). Os fatores que mais influenciam a composição do microbioma intestinal do idoso são: o local de residência (residência assistida, comunidade, hospital), o regime dietético, o uso de antibióticos ou outra medicação e estado geral de saúde (Bartosch, Fite, Macfarlane, & Mcmurdo, 2004; Claesson et al., 2012; Qato & Johnson, 2008).

1.2 Funções da microbiota intestinal

A comunidade bacteriana intestinal encontra-se separada do interior do organismo por uma única camada de células epiteliais, sendo através desta superfície mucosa do intestino do hospedeiro que a interação hospedeiro-bactéria ocorre (Chen, D'Souza, & Hong, 2013). Esta interação é vista como uma relação mutualista uma vez que ambos têm benefícios: as bactérias contribuem para o metabolismo do hospedeiro enquanto ocupam um ambiente protegido e rico em nutrientes (Hooper & Macpherson, 2010).

São várias as funções que a microbiota intestinal desempenha no organismo humano. Em particular, tem um papel extremamente importante no desenvolvimento e funcionamento do sistema imune inato e adquirido (Olszak et al., 2012; Round, O'Connell, & Mazmanian, 2010). Sabe-se ainda que é importante na distribuição da gordura corporal, na absorção de nutrientes que de outra forma seriam inacessíveis e no metabolismo dos lípidos (Bäckhed et al., 2004, 2005). Outras funções passam por fornecer proteção contra lesões nas células epiteliais, mantendo a homeostase do epitélio intestinal, proteção contra agentes patogénicos e xenobióticos e modulação da motilidade intestinal (Hooper et al., 2001; Rakoff-Nahoum, Paglino, Eslami-Varzaneh, Edberg, & Medzhitov, 2004; Verdu & Collins, 2004).

A microbiota intestinal é ainda extremamente importante na transmissão de sinais para o cérebro, uma vez que é essencial na comunicação entre o trato gastrointestinal e o sistema nervoso central (SNC) (Cryan & Dinan, 2012). Esta relação será mais detalhadamente abordada no capítulo 2.

1.3 Como se estuda a microbiota

De forma a perceber o papel da microbiota no organismo torna-se essencial identificar os microrganismos que o compõem. No passado recorria-se à cultura bacteriana das amostras recolhidas do local a estudar, contudo são poucos os microrganismos que podem ser cultivados (Chen et al., 2013; Eloë-Fadrosh & Rasko, 2013). Além do mais, a seleção dos meios mais indicados e os tempos de incubação necessários são consumidores de tempo, outro aspeto que torna este método pouco vantajoso (Chen et al., 2013). No entanto, a maior desvantagem deste método é o facto dos resultados experimentais não refletirem a dinâmica populacional das comunidades bacterianas, uma vez que não é possível cultivar um grupo de microrganismos em conjunto, sem alterar a frequência individual de cada espécie nessa população. Por essa razão foi necessário encontrar outras metodologias que fossem mais precisas (Chen et al., 2013).

A técnica mais utilizada pelos investigadores para identificar microrganismos em amostras consiste na sequenciação do DNA, sendo a metodologia mais comum a da sequenciação de um marcador – uma sequência de DNA pequena e única em cada espécie, que pode ser utilizada para identificar o genoma que a contem (Genetic Science Learning Center, 2014). Os marcadores possibilitam a identificação de um microrganismo sem que seja necessário proceder à sequenciação de todo o seu genoma, o que torna o processo mais rápido (Genetic Science Learning Center, 2014). Assim, para se proceder à caracterização taxonómica da comunidade bacteriana intestinal, a maioria dos estudos recorre à análise comparativa da sequência do gene do RNA ribossomal 16S (gene 16S rRNA), um componente da pequena subunidade dos ribossomas procarióticos (Eloë-Fadrosh & Rasko, 2013). Como é uma região bastante conservada em cada espécie é utilizada como um marcador genético microbiano. A sequência do gene 16S rRNA obtida da amostra é depois comparada com as sequências já conhecidas, reunidas numa base de dados, o que permite aos investigadores descobrir se essa amostra provém de uma espécie já conhecida ou, por contrário, se trata de uma espécie ainda não identificada. Estas bases de dados possuem inúmeras sequências de referência recolhidas em numerosos habitats, nomeadamente dos diferentes locais do organismo humano como por exemplo do intestino (Eloë-Fadrosh & Rasko, 2013; Genetic Science Learning Center, 2014).

Outra técnica bastante utilizada é a análise metagenômica, que é sobretudo utilizada para se proceder à caracterização funcional e identificação do genoma de toda a população microbiana presente num determinado ambiente, designadamente o trato gastrointestinal (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013). Pode-se então observar a combinação de genes presentes nessa comunidade e prever que funções estão a ser executadas pela mesma (Genetic Science Learning Center, 2014). Também neste caso existem bases de dados que permitem a comparação dos resultados e consequente identificação das comunidades microbianas (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013).

A conjugação destas duas técnicas permite não só identificar os microrganismos que constituem o microbioma intestinal, mas também perceber as suas funções, tal como se encontra esquematizado na figura 2 (Genetic Science Learning Center, 2014).

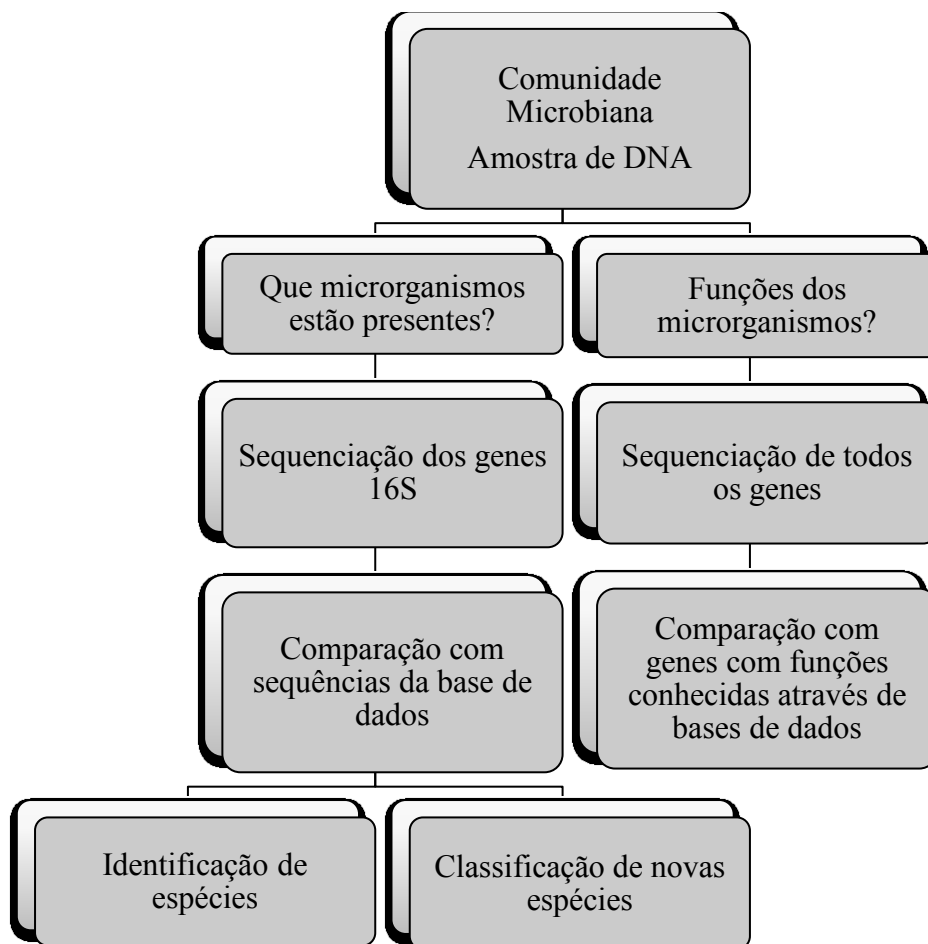


Figura 2 – Como se estuda o microbioma (adaptado de Genetic Science Learning Center, 2014)

A maioria dos estudos tem sido realizada em modelos animais nos quais a influência dos fatores genéticos do hospedeiro, bem como de fatores ambientais como a dieta, consegue ser bastante controlada (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013). A utilização de animais, sobretudo ratos livres de germes ou humanizados (ratos livres de germes que foram transplantados com uma comunidade microbiana proveniente de fezes humanas), fornece informação importante acerca das interações entre o hospedeiro e o seu microbiota. Contudo, as descobertas obtidas através dos modelos animais nem sempre podem ser diretamente translacionadas para humanos (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013).

Por fim, os estudos que incorporam a componente temporal permitem obter mais observações acerca da comunidade intestinal, em vez de apenas uma fotografia instantânea captando só um determinado instante. Assim, as dinâmicas existentes entre hospedeiro-microbiota podem ser analisadas diariamente, mensalmente, ou até mesmo anualmente (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013). De forma semelhante, os estudos que englobam a componente espacial também são importantes no contexto das interações bioquímicas e atividades que ocorrem na escala micrométrica (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013).

2. Eixo Intestino-Cérebro

A influência da microbiota intestinal estende-se para além do trato gastrointestinal, tendo um forte impacto no sistema nervoso central. Este conhecimento remonta ao século dezanove e início do século vinte, graças aos trabalhos pioneiros de William Beaumont, Claude Bernard, William James, Carl Lange, Ivan Pavlov, Charles Darwin e mais tarde, Walter Cannon. Charles Darwin observou que as secreções provenientes do “canal alimentar” e de outros órgãos eram afetadas por emoções fortes. Walter Cannon, o pai fundador do estudo da motilidade gastrointestinal, realçou a primazia do processamento cerebral na modulação da função intestinal, como foi referido por John Cryan e Timothy Dinan num dos seus trabalhos de revisão acerca deste tema (Cryan & Dinan, 2012).

Uma das mais antigas evidências da interação entre a comunidade bacteriana intestinal e o cérebro surgiu há 20 anos e advém da observação dos efeitos benéficos dos laxantes e antibióticos orais em doentes com encefalopatia hepática (Victor & Quigley, 2014).

Surge assim o conceito de eixo intestino-cérebro ou eixo cérebro-intestino, dependendo se nos referimos à via desde o intestino até ao cérebro ou à via oposta, que consiste num sistema de comunicação bidirecional envolvendo o sistema nervoso entérico (SNE), o nervo vago, o sistema nervoso simpático e parassimpático e o sistema endócrino e imune (Bercik, Collins, & Verdu, 2012). Mais tarde surgiu o conceito de eixo microbiota-intestino-cérebro como uma extensão do conceito anteriormente apresentado, com a intenção de salientar o papel da microbiota intestinal nesta comunicação, embora atualmente ambos os termos sejam utilizados de igual forma (Stilling, Dinan, & Cryan, 2014).

2.1 Mecanismos de ação do eixo intestino-cérebro

Como Yarandi e colegas (2016) referem num recente artigo de revisão, existem teoricamente diversos mecanismos através dos quais a microbiota intestinal influencia o cérebro, mecanismos esses que se sobrepõem e amplificam. Todos requerem que os microrganismos ou os seus produtos metabólicos acedam às camadas mais profundas do intestino, como a camada mucosa, a camada epitelial e a lâmina própria, de forma a ativarem diversos fatores que terão algum impacto a nível cerebral. A única exceção é a interface epitélio-microbiota pois a interação ocorre diretamente no local, não sendo necessário os microrganismos ou outros produtos atravessarem a barreira intestinal para os seus efeitos serem sentidos. Assim, a permeabilidade intestinal é provavelmente o fator mais importante a dar início às interações da microbiota com o restante organismo. De seguida serão referidos os diferentes mecanismos envolvidos na comunicação bidirecional ao longo do eixo intestino-cérebro, começando por se explicar mais aprofundadamente de que forma a barreira intestinal se encontra envolvida.

Barreira intestinal e sua permeabilidade

O epitélio intestinal é bastante importante na absorção dos nutrientes mas possui uma outra função igualmente importante – a de barreira física – função essa que é possível graças às *tight junctions* presentes entre as células epiteliais. A permeabilidade intestinal é essencial para o correto funcionamento do epitélio, pois caso esteja alterada vai permitir a passagem de microrganismos e outras substâncias o que significa que a função de barreira se encontra alterada (Yarandi et al., 2016).

A microbiota intestinal é essencial na prevenção da colonização por bactérias patogénicas, uma vez que compete com estas por nutrientes e fatores de crescimento (Kamada, Chen, Inohara, & Núñez, 2013). Quando esta microbiota normal é alterada, por exemplo devido à utilização de antibióticos, os organismos patogénicos podem colonizar o epitélio intestinal e produzir toxinas. Estas juntamente com a inflamação resultante da resposta imunitária gerada pela presença dessas toxinas, poderão levar ao aumento da permeabilidade intestinal (Feltis et al., 1999; Hecht, Pothoulakis, LaMont, & Madara, 1988).

Por outro lado, a microbiota intestinal pode também aumentar a função da barreira intestinal, protegendo e melhorando as *tight junctions*, função demonstrada em vários

estudos através da utilização de probióticos como tratamento em distúrbios gastrointestinais, que provocaram uma diminuição da permeabilidade intestinal (Gupta, Andrew, Kirschner, & Guandalini, 2000; Madsen et al., 2001).

Uma barreira intestinal debilitada leva a um aumento da permeabilidade, o que permite a passagem dos microrganismos intestinais para o tecido linfóide mesentérico (Dicksveld et al., 2012). Como o sistema nervoso entérico e as células imunitárias da mucosa intestinal ficam expostas a quantidades maiores de bactérias, poderão desencadear uma resposta imunitária, havendo libertação de citocinas inflamatórias e ativação do nervo vago e neurónios aferentes da medula espinal que, por sua vez, irão modular a atividade do sistema nervoso central (SNC) e entérico (Gareau, Silva, & Perdue, 2008). Por outro lado, este aumento de permeabilidade também permite a passagem de produtos do metabolismo da comunidade bacteriana, como lipopolissacarídeos (LPS) ou peptídeos neuroativos, que poderão alterar a atividade do SNC e SNE (Chakravarty & Herkenham, 2005; van Noort & Bsibsi, 2009). No caso dos LPS, estes podem ativar os recetores *toll-like* presentes nas células epiteliais, nos neurónios entéricos, nos neurónios sensoriais aferentes da coluna vertebral e várias células no cérebro, modulando a sua atividade e afetando dessa forma o funcionamento do SNE e do SNC (Yarandi et al., 2016). Estes são apenas dois mecanismos que são despoletados pela alteração da permeabilidade da barreira intestinal e que provocam efeitos a nível do cérebro.

Metabolitos bacterianos e neurotransmissores

Um outro mecanismo de comunicação entre o microbioma intestinal e o cérebro consiste na influência dos metabolitos bacterianos. Estes teoricamente podem ser absorvidos para a corrente sanguínea e assim ter efeito noutros órgãos, nomeadamente o cérebro, ou poderão interagir com elementos do próprio intestino como células endócrinas e nervos que, por sua vez, comunicam com o cérebro. Existem vários exemplos, como os já referidos LPS que podem influenciar o cérebro diretamente, ao ativarem os recetores *toll-like* das células da microglia o que causa a libertação de citocinas inflamatórias no SNC, ou indiretamente ao induzirem a libertação de citocinas inflamatórias no trato gastrointestinal (Yarandi et al., 2016). Outro exemplo consiste na digestão e fermentação dos carboidratos complexos a ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) pela microbiota intestinal no cólon, dando origem a acetato,

propionato e butirato, que possuem propriedades neuroativas (MacFabe, Cain, Boon, Ossenkopp, & Cain, 2011; Macfarlane & Macfarlane, 2003; Thomas et al., 2012). O butirato funciona como um inibidor da histona deacetilase, é utilizado como um substrato energético no cólon para a produção de ATP e é um ativador do recetor acoplado à proteína G (Bourassa, Alim, Bultman, & Ratan, 2016); o propionato causa acidificação intracelular o que pode produzir efeitos generalizados sobre a libertação de neurotransmissores; o acetato afeta sobretudo o metabolismo energético no cérebro (MacFabe et al., 2011).

As bactérias intestinais são ainda capazes de produzir diversos neurotransmissores e neuromoduladores como produtos secundários do seu metabolismo. Sabe-se que *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. produzem ácido gama-aminobutírico (GABA) (Barrett, Ross, O'Toole, Fitzgerald, & Stanton, 2012; Lyte, 2011), enquanto *Candida* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. e *Enterococcus* spp. produzem serotonina, *Bacillus* spp. produz dopamina, *Escherichia* spp., *Bacillus* spp. e *Saccharomyces* spp. produzem noradrenalina e *Lactobacillus* spp. produz acetilcolina (Lyte, 2011). O GABA é um dos mais importantes neurotransmissores do SNC sendo o principal neurotransmissor inibitório no cérebro, regulando diversos processos fisiológicos e psicológicos, de tal forma que desregulações neste sistema se encontram associadas a ansiedade e depressão (Barrett et al., 2012). A serotonina (5-HT) é um metabolito do aminoácido triptofano sendo um outro importante neurotransmissor do SNC e do trato gastrointestinal. Esta regula uma série de funções no organismo como o humor e o comportamento, o sono, o apetite, os ciclos circadianos e outras funções neuroendócrinas, sendo também responsável por regular os movimentos intestinais (Frazer & Hensler, 1999). A dopamina também regula diferentes funções do SNC incluindo a locomoção, a cognição, as emoções e a secreção de hormonas, e alterações na sua neurotransmissão estão associadas a diversas disfunções cerebrais (Jaber, Robinson, Missale, & Caron, 1996). A noradrenalina é um neurotransmissor do sistema nervoso simpático essencial para as respostas de fuga ou luta, aumentando a frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo para o músculo-esquelético, preparando assim o cérebro para responder aos estímulos do exterior (Rogers, 2015). No SNC, a acetilcolina é sobretudo importante no desempenho de funções cognitivas como a aprendizagem e a memória (Hasselmo, 2006).

No que toca ao papel dos neurotransmissores no eixo intestino-cérebro, é referido bastantes vezes o impacto do metabolismo do triptofano e funcionamento do sistema serotoninérgico. Isto pois a desregulação do metabolismo do triptofano encontra-se envolvida em diversas doenças do trato gastrointestinal e distúrbios cerebrais (Cryan & Dinan, 2012; O'Mahony et al., 2015). Vários estudos com ratos livres de germes verificaram que estes possuem níveis mais elevados de triptofano no plasma, níveis superiores de serotonina, havendo também estudos que observaram alterações no rácio de quinurenina: triptofano nestes animais. Para além destes dados, a própria microbiota intestinal poderá utilizar o triptofano diminuindo a sua disponibilidade para o hospedeiro (O'Mahony et al., 2015). Alguns destes estudos serão abordados mais à frente de forma mais pormenorizada no contexto de doenças específicas.

Nervo Vago

É possivelmente através do nervo vago que todos estes processos poderão influenciar a atividade do SNC (Yarandi et al., 2016). O nervo vago, também designado de X nervo craniano, é o maior nervo do sistema parassimpático e inerva órgãos do pescoço, tórax e abdómen, coordenando diversas funções vitais do organismo. É responsável pela manutenção da homeostase metabólica através da regulação do ritmo cardíaco, da motilidade gastrointestinal e da produção das suas secreções, da produção da glicose hepática e da produção das secreções pancreáticas. É ainda um componente importante no reflexo inflamatório, que controla as respostas imunitárias e a inflamação aquando da invasão por organismos patogénicos e em casos de lesão tecidual (Pavlov & Tracey, 2012). Vários estudos animais evidenciaram a comunicação entre a microbiota intestinal e o SNC através do nervo vago, verificando-se que na infeção intestinal com certos microrganismos patogénicos como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Typhimurium* ou *Citrobacter rodentium*, a informação é transmitida do intestino ao cérebro através do nervo vago (Goehler et al., 2005; X. Wang et al., 2002), observando-se também que os animais testados apresentavam alterações no comportamento como ansiedade (Lyte, Li, Opitz, Gaykema, & Goehler, 2006). A ativação do nervo vago foi verificada pelo aumento da expressão de c-fos no cérebro, que é utilizado como marcador da atividade neuronal (Goehler et al., 2005; Lyte et al., 2006; X. Wang et al., 2002). Também se verificou que em ratos vagotomizados não existe transmissão dos efeitos a nível do comportamento e dos efeitos neuroquímicos (X. Wang et al., 2002). A administração de certos probióticos também provoca alterações no comportamento

estando esse efeito dependente da ativação deste nervo (Perez-Burgos et al., 2013). Como os indícios da existência deste mecanismo de comunicação ao longo do eixo intestino-cérebro são vastos, estes serão novamente abordados mais pormenorizadamente no capítulo 2.3 de forma a melhor se compreender as vias envolvidos na comunicação entre a microbiota intestinal e o cérebro nas doenças mentais.

Eixo hipotálamo-hipófise

Como foi referido anteriormente, a comunicação ao longo do eixo intestino-cérebro é bidirecional, portanto da mesma forma que a microbiota intestinal pode influenciar o cérebro através dos mecanismos apresentados, também o cérebro pode alterar o funcionamento do intestino e ter algum impacto na microbiota. O SNC e mais especificamente o eixo hipotálamo-hipófise ou “hypothalamic pituitary adrenal axis” (HPA), podem ser ativados em resposta a fatores ambientais tais como emoções ou *stress*, sendo que o eixo hipotálamo-hipófise é considerado o principal eixo eferente que controla as respostas adaptativas do organismo a qualquer estímulo stressante (Tsigos & Chrousos, 2002). A ativação deste eixo leva à produção de fator de libertação de corticotrofina - “corticotropin releasing factor” (CRF) - pelo hipotálamo, estimula a secreção da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) pela hipófise que, por sua vez, leva à libertação de cortisol pelas glândulas suprarrenais (Burke, Davis, Otte, & Mohr, 2005). O cortisol é a principal hormona responsável pela resposta ao *stress*, afetando muitos órgãos incluindo o cérebro. Também afeta as células imunitárias, levando à produção de citocinas, pode alterar a permeabilidade do intestino e a sua função de barreira, o que permite a modificação da microbiota (Cryan & Dinan, 2012). Todos estes mecanismos se encontram esquematizados na figura 3.

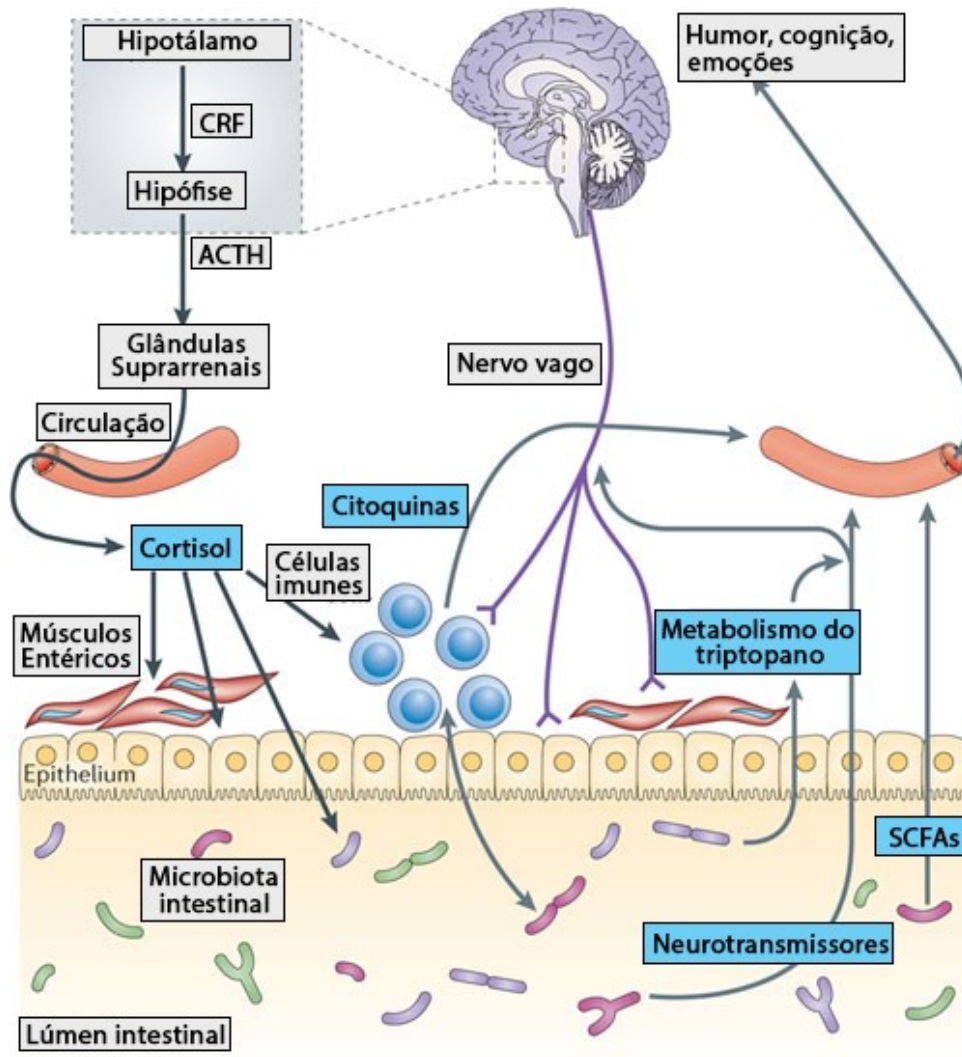


Figura 3 - Mecanismos envolvidos na comunicação bidirecional do eixo intestino-cérebro (adaptado de Cryan e Dinan, 2012)

2.2 Como se estuda o papel da microbiota na saúde e doença

O papel da microbiota intestinal no eixo intestino-cérebro e, mais especificamente, que impacto esta comunicação bidirecional poderá ter na manutenção da saúde ou no desenvolvimento de doenças, tem sido demonstrado por diferentes abordagens experimentais em modelos pré-clínicos. Estas englobam a manipulação da microbiota intestinal através da ingestão de antibióticos ou probióticos, alteração da dieta (De Filippo et al., 2010; Wu et al., 2011), transplante fecal, modelos animais com animais livres de germes ou livres de patogénicos específicos e estudos de infeção, tal como representado na figura 4 (Cryan & Dinan, 2012; Mayer, Knight, Mazmanian, Cryan, & Tillisch, 2014). Cada um destes modelos irá ser abordado de seguida.

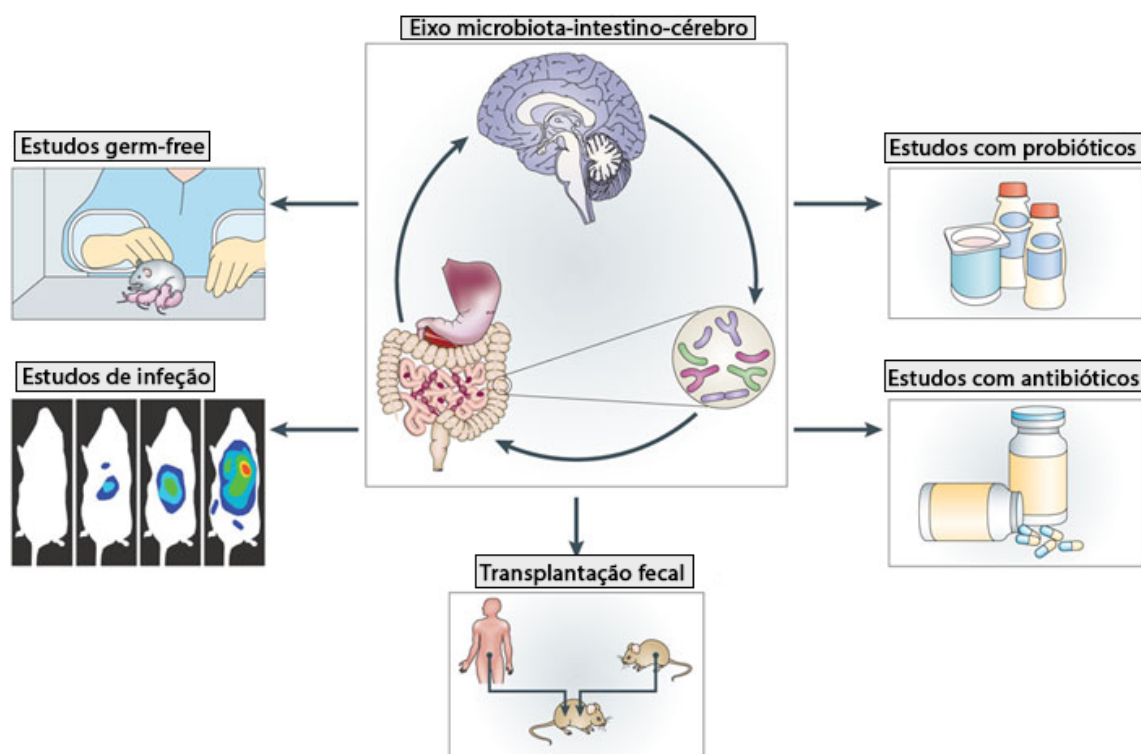


Figura 4 - Abordagens experimentais para estudo da microbiota e eixo intestino-cérebro (adaptado de Cryan e Dinan, 2012)

Probióticos

Probióticos são definidos como organismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas beneficiam a saúde do hospedeiro (Quigley, 2008). Estes colonizam transitoriamente o trato gastrointestinal, aumentando a concentração de microrganismos benéficos o que promove a criação de um equilíbrio na microbiota

intestinal do hospedeiro, que em casos de doença se encontra desregulada (Sherman, Ossa, & Johnson-Henry, 2009). Possuem ações muito diversas podendo atuar no lúmen do intestino através da produção de moléculas antibacterianas, podem melhorar a função de barreira da mucosa intestinal ao aumentarem a produção de moléculas imunitárias, ou podem promover as respostas imunitárias adaptativas entre outras funções (Sherman et al., 2009). Olhando para a totalidade de estudos que existem acerca deste tema, é possível concluir que existem diversas estirpes de probióticos capazes de modular diferentes aspetos do eixo microbiota-intestino-cérebro. Contudo, estes efeitos são dependentes da estirpe bacteriana sendo necessária precaução quando se extrapolam dados de um organismo para outro, tornando-se importante tentar identificar os mecanismos através dos quais cada estirpe exerce os seus efeitos. Além do mais, é requerida validação clínica para que se possa investigar que efeitos observados nos estudos animais, poderão ser observados também em humanos (Cryan & Dinan, 2012).

Antibióticos

O uso de antibióticos é um dos métodos artificiais mais comum para induzir disbiose intestinal – desequilíbrio da microbiota intestinal – em animais (Cryan & Dinan, 2012). De forma a analisar-se o impacto que as alterações na flora intestinal têm no desenvolvimento da hipersensibilidade visceral, foram administrados dois antibióticos (neomicina e bacitracina) em ratos adultos. Estes antibióticos provocaram uma perturbação na microbiota, diminuindo a quantidade de bactérias do género *Bacteroides* (filó Bacteroidetes) e do género *Enterococcus* (filó Firmicutes), eliminando as bactérias do género *Lactobacillus* (filó Firmicutes) do intestino. Verificou-se também que estas alterações estavam associadas a um aumento da hipersensibilidade visceral em resposta à distensão colorretal (Verdú et al., 2006).

A utilização de antibióticos permite portanto, a alteração da composição da microbiota de forma temporariamente controlada e clinicamente realista sendo uma ferramenta poderosa na avaliação do impacto da microbiota, por exemplo no comportamento. Porém, aquando da interpretação dos efeitos dos mesmos, é necessário ter em consideração que muitos antibióticos podem ser tóxicos a nível sistémico (Cryan & Dinan, 2012).

Estudos de infecção

Os estudos de infecção são utilizados para estudar o impacto das infecções causadas por agentes patogénicos entéricos, sobretudo a nível do cérebro e do comportamento, permitindo também observar as funções do eixo microbiota-intestino-cérebro (Cryan & Dinan, 2012). São utilizados diferentes microrganismos que desencadeiam efeitos e mecanismos de comunicação diferentes, mas todos eles possuem a capacidade de infetar o trato gastrointestinal. Bercik et al. (2010) procuraram perceber de que forma uma inflamação crónica do intestino poderia alterar o comportamento, tendo infetado ratos com *Trichuris muris*, um parasita bastante próximo do parasita humano *T. trichiura*. Vários estudos recorreram ao microrganismo *Citrobacter rodentium* como agente infeccioso, uma bactéria presente nos roedores equivalente à bactéria enteropatogénica *Escherichia coli*, com o objetivo de estudar a função do eixo intestino-cérebro (Gareau et al., 2011; Lyte et al., 2006). Outros exemplos de microrganismos utilizados nestes estudos são *Campylobacter jejuni*, uma bactéria que contamina os alimentos sendo uma das principais causadoras de diarreia nos humanos e *Salmonella Typhimurium*, outra bactéria causadora de diarreia e enterite (Goehler et al., 2005; X. Wang et al., 2002).

Geralmente estes estudos não demonstram diretamente a forma como a microbiota interage com o cérebro, embora permitam elucidar os mecanismos através dos quais estes agentes patogénicos causadores de infecção conseguem comunicar com o cérebro e alterar o comportamento, mecanismos estes que são diferentes de caso para caso (Cryan & Dinan, 2012).

Transplante fecal

O transplante fecal é um procedimento através do qual é recolhida matéria fecal de um dador saudável sendo, posteriormente, transferida para um indivíduo doente com objetivo terapêutico. Atualmente é sobretudo utilizado para o tratamento da infecção recorrente por *Clostridium difficile*. É uma metodologia utilizada em diferentes estudos para testar se a reintrodução de uma microbiota normal proveniente das fezes de um dador saudável, é capaz de corrigir o desequilíbrio da microbiota e restabelecer o normal funcionamento intestinal em determinadas patologias (Bakken et al., 2011; De Palma et al., 2015).

Dieta

Também a dieta tem um importante impacto na comunidade bacteriana presente no intestino, o que se verifica pelas diferenças encontradas na microbiota intestinal de indivíduos residentes em países diferentes. Um estudo que comparou crianças europeias com crianças residentes em Burkina Faso (África), verificou que as crianças italianas que tinham uma dieta tipicamente ocidental rica em proteína animal e gordura, possuíam uma maior comunidade de *Bacteroides*, enquanto as crianças africanas que tinham uma alimentação rica em carboidratos e pobre em proteína animal, tinham maior predominância de bactérias do género *Provetella* no seu microbioma intestinal (De Filippo et al., 2010). Wu et al. (2011) confirmou em voluntários saudáveis que dietas prolongadas ricas em gordura e pobres em fibra, se encontravam associadas a uma predominância de bactérias do filo Bacteroidetes e Actinobacteria e que pelo contrário, dietas ricas em fibras e pobres em gordura originavam uma microbiota intestinal rica em bactérias do filo Firmicutes e do filo Proteobacteria. Contudo também notaram que os enterotipos não sofreram alteração aquando das modificações da dieta a curto prazo, mas que a microbiota intestinal em geral sofreu alterações mal a alimentação foi mudada, o que permite concluir que a dieta poderá ser utilizada para manipular a microbiota intestinal.

Animais livres de germes

Um outro modelo bastante utilizado é o que recorre à utilização de “germ-free animals” – animais livres de germes, que consistem em animais, geralmente ratos, desprovidos de qualquer colonização bacteriana e que por essa razão permitem o estudo do impacto da completa ausência de microbiota intestinal, ou seja, permitem perceber qual o papel da microbiota em todos os aspetos da fisiologia. Esta abordagem parte do princípio que o ambiente uterino é estéril e assim a colonização do trato gastrointestinal ocorre após o nascimento. Estes animais são mantidos num ambiente estéril em unidades gnotobióticas, para que esta colonização pós-natal não ocorra e possa ser feita uma comparação direta com os animais que foram colonizados possuindo, por isso, uma microbiota intestinal (Cryan & Dinan, 2012). A utilização de animais livres de germes permite testar se a microbiota se encontra envolvida num determinado aspeto do funcionamento do cérebro, qual o impacto de uma bactéria específica ou alteração a

nível da dieta no eixo intestino-cérebro isoladamente e permite ainda estudar o efeito da transplantação fecal na microbiota intestinal (Mayer et al., 2014).

É no entanto importante referir que as informações recolhidas através destes ensaios não são translacionais para doenças humanas, uma vez que não existe nos humanos nenhuma situação de total obliteração da microbiota, para além de que os próprios animais utilizados podem possuir mecanismos fisiológicos diferentes dos humanos (Cryan & Dinan, 2012).

2.3 Eixo intestino-cérebro e doença mental

A microbiota intestinal é um agente essencial na manutenção da homeostase estando a disbiose envolvida no desenvolvimento de doenças gastrointestinais e sistêmicas (Grenham et al., 2011). Como se encontra representado na figura 5, uma microbiota intestinal estável é fundamental para a manutenção da fisiologia normal do intestino e contribui para a correta transmissão de sinais ao longo do eixo intestino-cérebro, o que permite a manutenção da saúde do indivíduo (lado esquerdo do diagrama). Por sua vez, como se pode observar do lado direito do diagrama da figura 4, a disbiose intestinal pode influenciar negativamente a fisiologia do intestino, provocando uma transmissão de estímulos inapropriada ao longo do eixo intestino-cérebro e conseqüentemente, fazer surgir alterações nas funções do SNC e o desenvolvimento de doenças. O *stress* também pode afetar a microbiota modificando a sua composição, uma vez que pode influenciar as funções do intestino (Grenham et al., 2011).

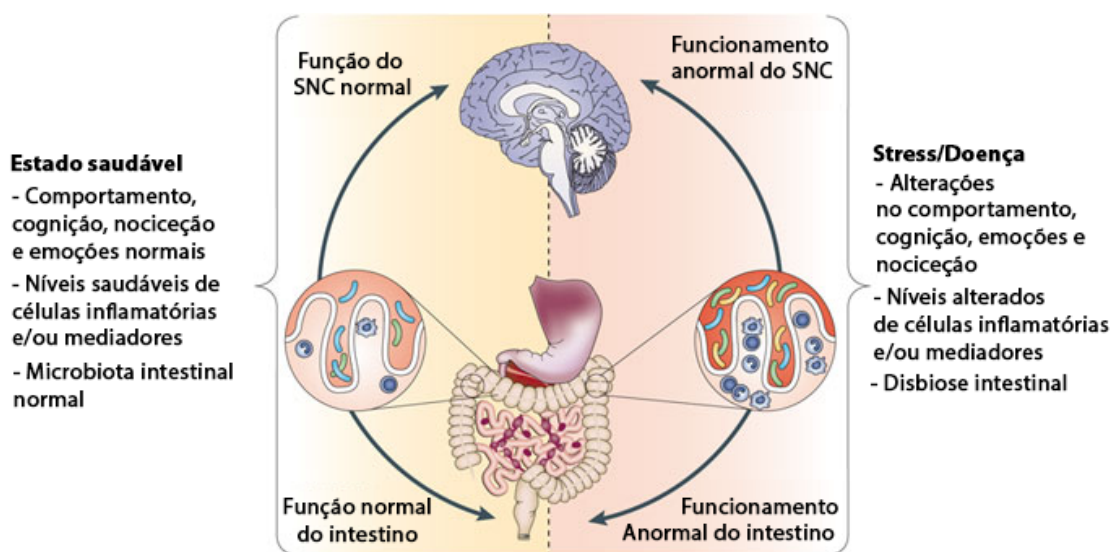


Figura 5 - Eixo microbiota-intestino-cérebro na saúde e doença (adaptado de Cryan e Dinan, 2012)

A criação da microbiota ocorre em paralelo com o desenvolvimento neurológico e dessa forma ambos têm janelas críticas de desenvolvimento semelhantes que são sensíveis a danos (Borre et al., 2014). Nos últimos anos têm surgido cada vez mais estudos que indicam que o eixo intestino-cérebro e a microbiota intestinal, têm um papel crucial durante as diferentes fases do neurodesenvolvimento, ao sugerirem que durante a colonização inicial e desenvolvimento da microbiota certos eventos podem determinar o estado de saúde, nomeadamente saúde mental, em fases mais tardias da vida do indivíduo (Borre et al., 2014). A infância e a adolescência correspondem aos

períodos mais dinâmicos a nível do desenvolvimento do cérebro e da microbiota e portanto, alterações nestes períodos poderão modificar profundamente a sinalização ao longo do eixo intestino-cérebro, afetar a saúde ao longo da vida e aumentar o risco ou até mesmo levar ao aparecimento de distúrbios do desenvolvimento neurológico, como se pode observar na figura 6 (Borre et al., 2014).

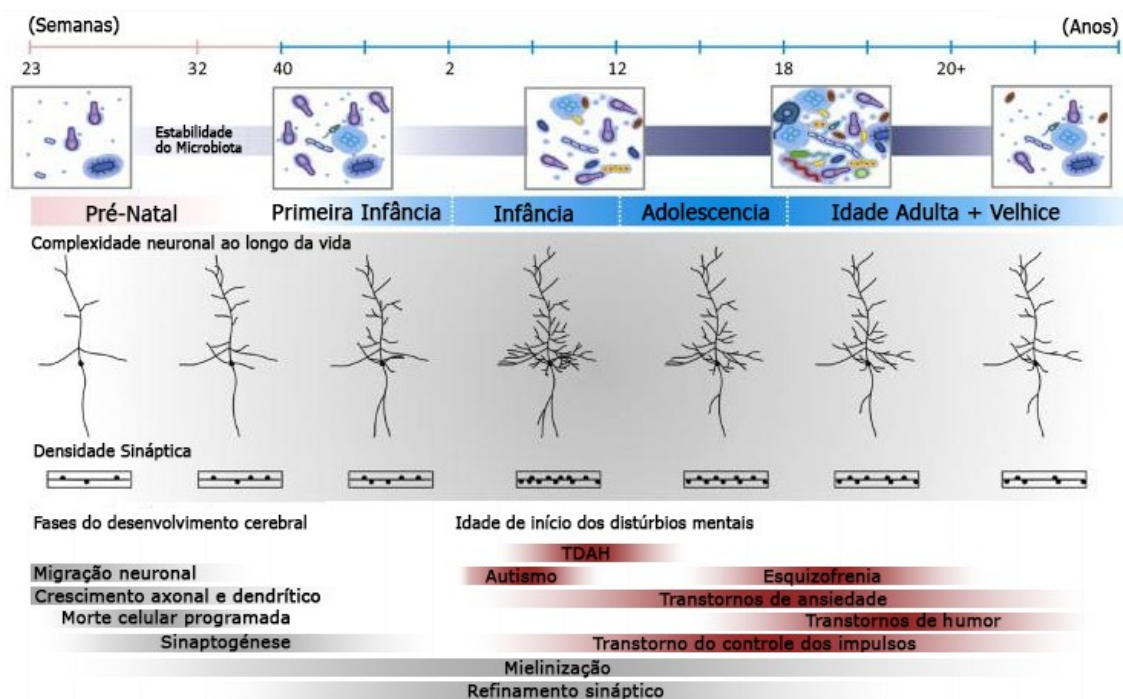


Figura 6 – Desenvolvimento neurológico e desenvolvimento da microbiota ao longo da vida e sua relação com aparecimento de doenças mentais (adaptado de Borre et al., 2014)

2.3.1 Resposta ao *stress* e ansiedade

O *stress* pode ser físico ou psicológico e foi definido como sendo um estado que pode alterar a homeostase do organismo (Chrousos & Gold, 1992). Existem diversos estudos sobre a relação entre o *stress*, a microbiota intestinal e o desenvolvimento de alterações no comportamento, nomeadamente ansiedade, que estudam esta relação nas diferentes fases da vida.

Uma vez que a infância é uma fase tão importante no desenvolvimento da microbiota e da saúde mental, torna-se necessário perceber de que forma o *stress* nos primeiros tempos de vida pode levar a alterações no comportamento na idade adulta (De Palma et al., 2015). Um estudo recente utilizou a separação materna como método de indução de *stress* pós-natal, tendo como objetivo investigar a contribuição da microbiota intestinal e fatores do hospedeiro no desenvolvimento de alterações comportamentais em ratos, uma vez que está demonstrado que esta separação provoca alterações no comportamento e disfunção intestinal a longo prazo (De Palma et al., 2015). Recorrendo a ratos livres de germes e a ratos livres de patogénicos específicos – ratos que possuem uma microbiota de composição normal não apresentando microrganismos patogénicos, verificaram que a separação materna alterou a composição da microbiota nos ratos livres de patogénicos específicos e que esta se manteve na idade adulta. Concluíram desta forma que a separação materna é responsável pela indução de disbiose intestinal na infância que persiste na idade adulta. As maiores diferenças observadas ocorreram na quantidade de bactérias tanto do filo Firmicutes como do filo Bacteroidetes, que aumentaram o seu número, tendo as bactérias dos outros filós sofrido uma diminuição bastante significativa. A separação materna induziu também ansiedade nos ratos livres de patogénicos específicos mas não nos ratos livres de germes – ratos que se sabe terem um comportamento naturalmente ansiolítico. O aumento da ansiedade refletiu-se na execução de algumas tarefas: demoraram mais tempo a descer de uma plataforma elevada, passaram menos tempo no compartimento iluminado tendo demorado mais tempo a entrar novamente no mesmo e mantiveram-se imóveis mais tempo no teste de suspensão da cauda, resultados indicativos de comportamento ansioso. Procedeu-se posteriormente à colonização dos ratos adultos livres de germes, tanto do grupo controlo como do grupo sujeito a separação materna, com microbiota dos ratos controlo livres de patogénicos específicos. Após 3 semanas a composição da microbiota intestinal destes dois grupos era distinta, embora tenham sido colonizados com amostras

do mesmo dador. Enquanto o grupo controlo possuía sobretudo bactérias do filo Firmicutes tendo ainda algumas bactérias do filo Bacteroidetes mas de mais nenhum outro filo, o grupo sujeito a separação materna apresentou uma diminuição na quantidade de bactérias do filo Firmicutes e um aumento do filo Bacteroidetes. Esta colonização tornou os ratos livres de germes sujeitos a separação materna mais ansiosos demorando mais tempo a descer da plataforma e passando mais tempo imóveis, mas tal não se observou nos ratos livres de germes controlo. Por último, foi transferida microbiota intestinal dos ratos livres de patogénicos específicos sujeitos a separação materna para os ratos livres de germes controlo. Após a colonização, verificou-se que o comportamento ansioso e a microbiota alterada destes ratos não foram adquiridos pelos ratos livres de germes controlo cuja microbiota voltou ao normal, o que demonstra que fatores do hospedeiro presentes nos ratos sujeitos a separação materna mas não nos ratos controlo, são necessários para selecionar e manter a microbiota associada à separação materna (De Palma et al., 2015).

Um outro trabalho debruçou-se no impacto da depleção da microbiota intestinal na adolescência e as suas implicações no comportamento na idade adulta (Desbonnet et al., 2015). O tratamento com uma combinação de antibióticos provocou uma diminuição significativa do número de bactérias intestinais bem como da sua diversidade no intestino adulto dos ratos, sendo que ocorreu uma diminuição da abundância de Firmicutes e Bacteroidetes ao mesmo tempo que aumentou a abundância de Proteobacterias e Cyanobacterias. Esta depleção da microbiota intestinal induziu alterações nas concentrações de vários neuromoduladores, como o triptofano ou a quinurenina, importantes na regulação de comportamentos associados a desregulações do eixo intestino-cérebro. Estas alterações foram acompanhadas de uma redução da ansiedade como verificado pelo aumento do tempo despendido pelos animais no compartimento iluminado no teste de transição claro/escuro. Em conclusão, os dados recolhidos neste estudo sugerem que a adolescência e o início da idade adulta representam períodos críticos, nos quais perturbações a nível da microbiota intestinal e desregulação na comunicação do eixo microbiota-intestino-cérebro, podem ter um impacto significativo no desenvolvimento cerebral levando ao aparecimento de comportamento ansioso na idade adulta (Desbonnet et al., 2015).

Um estudo publicado em 2004 recorreu ao uso de ratos adultos livres de germes, para testar a hipótese do envolvimento da microbiota intestinal no desenvolvimento dos

sistemas neurais que controlam a resposta endócrina ao *stress*. Para isso analisaram a resposta do eixo HPA ao *stress*, comparando um grupo de ratos livres de germes com um grupo de ratos controle livres de patógenos específicos. Verificaram então que os ratos livres de germes possuíam níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona bastante mais elevados do que os ratos livres de patógenos específicos, em resposta ao mesmo ambiente confinado indutor de *stress*, tendo também expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (“brain-derived neurotrophic factor” – BDNF) mais baixo que os ratos livres de patógenos específicos. A resposta ao *stress* nos ratos livres de germes foi parcialmente revertida através da colonização com matéria fecal dos animais controle e foi totalmente revertida com a associação de *Bifidobacterium infantis*. Foi ainda observado que esta reversão apenas acontecia quando a colonização era feita numa fase inicial do desenvolvimento, dado indicativo de que a exposição aos microrganismos nesta fase tenha um impacto importante no desenvolvimento do eixo HPA (Sudo et al., 2004).

No seguimento deste trabalho foram vários os autores que tentaram perceber de que forma essas alterações são visíveis a nível de comportamento.

Tanto os estudos de Heijtz et al. (2011) como os de Neufeld, Kang, Bienenstock e Foster (2011b) confirmaram que ratos livres de germes tinham um comportamento menos ansioso que o de ratos livres de patógenos específicos. O comportamento dos animais foi avaliado através do teste do labirinto em cruz elevado e da transição claro/escuro, verificando-se que os ratos livres de germes passaram significativamente mais tempo no braço aberto do labirinto bem como no compartimento iluminado em comparação com os ratos livres de patógenos específicos. Heijtz e colegas testaram também se a colonização dos ratos livres de germes nos primeiros tempos de vida, poderia normalizar o seu comportamento. Para isso, um grupo livre de germes foi colonizado com microbiota proveniente dos ratos livres de patógenos específicos antes do acasalamento. A descendência foi posteriormente observada, verificando-se que o comportamento desta era significativamente diferente aos dos progenitores e que apresentava níveis de ansiedade iguais aos dos ratos livres de patógenos específicos, já que os resultados dos testes ao comportamento foram em tudo semelhantes aos destes animais. No seguimento destas observações, procuraram perceber se a colonização de ratos adultos livres de germes com microbiota intestinal dos ratos livres de patógenos específicos, poderia normalizar o seu comportamento tal como tinha feito à

descendência, mas tal não aconteceu sendo demonstrativo da existência de um período crítico no desenvolvimento da microbiota e do comportamento, o mesmo sendo verificado por Neufeld, Kang, Bienenstock e Foster (2011a) num estudo realizado posteriormente. Como a ansiedade está associada a modificações na neurotransmissão das monoaminas, investigou-se se haveria alterações neuroquímicas nos ratos livres de germes. Estes apresentaram elevação dos níveis de noradrenalina, dopamina e serotonina no corpo estriado, mas não no hipocampo nem no córtex (Heijtz et al., 2011). Foi também detetado que os ratos livres de germes apresentaram alterações nos genes relacionados com a plasticidade, nomeadamente a nível do mRNA de BDNF, que possuem um importante papel no comportamento emocional dos ratos (Heijtz et al., 2011; Neufeld et al., 2011b). Neufeld e colegas reunindo os dados obtidos nos dois trabalhos realizados, concluíram que a presença ou ausência de microbiota intestinal convencional influencia o desenvolvimento do comportamento, sendo acompanhado de mudanças neuroquímicas no cérebro, para além de que as vias neurais são alteradas no início do desenvolvimento reforçando a ideia de que existe uma janela crítica no período pós-natal, no qual disfunções no eixo HPA e traços comportamentais ficam consolidados para a idade adulta, como tinha sido proposto por Sudo et al. (2004).

Clarke et al. (2013) realizaram um estudo semelhante ao de Heijtz e de Neufeld mas focaram os seus esforços em perceber de que forma a microbiota intestinal poderia afetar o sistema serotoninérgico no hipocampo, também importante no controlo do *stress* e ansiedade. Como a regulação deste sistema varia com o sexo verificaram também se haveria diferenças a este nível. Observaram que tanto machos como fêmeas de ratos livres de germes apresentavam um aumento da reatividade do eixo HPA, através de um aumento dos níveis de corticosterona após um estímulo stressante. Contudo, apenas houve um aumento da concentração de serotonina nos ratos do sexo masculino. Também os níveis de triptofano e o seu metabolismo se encontravam alterados nos animais livres de germes. Os machos apresentavam concentrações de triptofano superiores ao das fêmeas e do grupo controlo, mas os ratos de ambos os sexos apresentaram uma diminuição do rácio quinurenina:triptofano, demonstrando que o metabolismo do triptofano ao longo da via da quinurenina se encontra alterado. Neste mesmo trabalho foi ainda testado se as alterações observadas poderiam ser revertidas através da colonização no período pós-desmame. Verificou-se que o aumento dos níveis de serotonina e do seu metabolito é resistente à colonização, mas esta restaura os níveis

de triptofano e do rácio quinurenina:triptofano. Quanto ao comportamento, à semelhança do que foi observado por Heijtz e Neufeld, verificou-se que a redução na ansiedade presente nos ratos livres de germes é reversível quando estes são colonizados nos primeiros tempos de vida. Neste trabalho demonstrou-se que o sistema serotoninérgico é afetado pela presença ou ausência de microbiota intestinal, existindo diferenças entre os sexos. Em adição, verificou-se que estas alterações neuroquímicas mas não as comportamentais, são resistentes à restauração da microbiota intestinal demonstrando o quão difícil é reverter as modificações neuroquímicas induzidas pela ausência de microbiota nos primeiros tempos de vida (Clarke et al., 2013).

Não só a flora bacteriana intestinal endógena ou a sua ausência, influenciam o aparecimento de ansiedade na idade adulta. Também várias bactérias patogénicas provocam esta alteração no comportamento.

A infeção subclínica com *Campylobacter jejuni* teve um efeito ansiogénico nos ratos infetados, que percorreram distâncias mais reduzidas na zona central da tábua de buracos (teste de *hole-board*) para além de não explorarem os orifícios tão frequentemente e também passaram menos tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, enquanto o número de entradas nos braços fechados aumentou (Goehler, Park, Opitz, Lyte, & Gaykema, 2008; Lyte, Varcoe, & Bailey, 1998). Verificou-se ainda que em ambos os estudos não houve indução de uma resposta imunitária.

A infeção com *Citrobacter rodentium* é outro exemplo de um agente patogénico indutor de ansiedade que não ativa nenhuma resposta imunitária (Lyte et al., 2006). Verificou-se que poucas horas após a infeção os ratos apresentavam um comportamento ansioso, identificado através da utilização do teste de *hole-board* onde os ratos infetados evitaram a região central mais vezes que os controlos, passando muito pouco tempo no centro e percorrendo distâncias mais curtas, preferindo manter-se num canto e não explorando os orifícios mais distantes. Neste estudo foi também observado que os sintomas de ansiedade provocados por *Citrobacter rodentium* são provavelmente mediados através dos neurónios sensoriais vagais, uma vez que os animais infetados evidenciaram mais neurónios positivos para a proteína c-fos, o que é consistente com a transmissão de sinais do intestino ao cérebro por via vagal.

No entanto, há também casos de parasitas que provocam inflamação intestinal sendo responsáveis pelo desenvolvimento de ansiedade, como é o caso do parasita *Trichuris*

muris (Bercik et al., 2010). Os animais infetados com este microrganismo desenvolveram ansiedade, passando menos tempo no compartimento iluminado durante a realização do teste de transição claro/escuro e demoraram mais tempo a descer de uma plataforma elevada. A esta alteração no comportamento foi associada uma diminuição dos níveis de mRNA de BDNF no hipocampo e um aumento dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, bem como do rácio quinurenina:triptofano. A administração dos anti-inflamatórios etanercept e budenosina normalizou o comportamento e reduziu os níveis de citocinas e quinurenina. Contudo, a administração destes fármacos não teve qualquer efeito na expressão de BDNF. Por outro lado, a administração do probiótico *Bifidobacterium longum* permitiu uma normalização do comportamento e restaurou os níveis de mRNA de BDNF, mas não teve qualquer efeito na normalização dos níveis de citocinas e quinurenina. Verificou-se ainda que a vagotomia realizada antes da infeção com o parasita, não preveniu o aparecimento do comportamento ansioso nos ratos o que indica que o nervo vago não é responsável pela transmissão dos efeitos a nível de comportamento após a infeção. Os autores demonstraram desta forma que a infeção crónica associada a inflamação intestinal causada pelo parasita *T. muris*, induz alterações a nível do comportamento nos ratos testados.

2.3.2 Capacidade cognitiva

Nos ratos, a eliminação ou alteração da composição da microbiota intestinal pode provocar alterações a nível da cognição, nomeadamente a nível da memória. No estudo realizado por Gareau et al. (2011) verificou-se que os ratos livres de germes possuíam um défice na memória não-espacial e na memória de trabalho, quando comparados com o grupo de ratos livres de patógenos específicos, uma vez que demonstraram baixas proporções de exploração no teste do labirinto em T e face a novos objetos. Estes autores optaram também por ver se a exposição a um estímulo stressante poderia exercer alguma alteração a nível da memória, mas tal não se verificou. Observou-se ainda que a cognição alterada nestes ratos é acompanhada pela redução de BDNF e c-fos, importantes na regulação da memória dependente do hipocampo. Neste mesmo trabalho ainda se estudou o impacto da infeção com *C. rodentium*, tendo-se observado que a infeção por si só não causou alterações a nível da memória nos ratos com microbiota normal. Contudo, após a exposição única a um estímulo stressante, os ratos infetados demonstraram possuir uma diminuição da memória não-espacial e na memória de trabalho. Estes defeitos cognitivos induzidos pelo *stress* mantiveram-se mesmo após a cura da infeção (cerca de 30 dias depois da inoculação), estando também associados a uma diminuição dos níveis de BDNF e c-fos. Em conclusão, estes autores demonstraram que a microbiota intestinal influencia a capacidade de formação da memória, uma vez que os ratos livres de germes não possuindo microbiota têm esta função comprometida, enquanto os ratos infetados apenas apresentam disfunções na memória quando expostos a *stress*. Este último dado sugere que uma infeção bacteriana entérica poderá ativar o eixo HPA de tal forma que a exposição a um estímulo stressante é suficiente para provocar uma resposta comportamental anormal que resulta numa alteração na memória. Visto que houve uma diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo nos ratos infetados, as alterações na memória poderão surgir como resultado da infeção entérica devido à redução que esta provoca no BDNF.

De forma semelhante, Desbonnet et al. (2015) observaram que a depleção da microbiota intestinal de ratos adolescentes através da administração de antibióticos, provoca alterações cognitivas, uma vez que estes animais exibiam uma capacidade reduzida para diferenciar um objeto novo de um já anteriormente apresentado, possuindo também níveis reduzidos de BDNF no hipocampo.

Um outro exemplo da influência da microbiota intestinal na cognição é o caso da bactéria *Mycobacterium vaccae*, uma bactéria aeróbica, considerada como um comensal transiente devido à incapacidade de colonizar eficazmente o trato gastrointestinal anaeróbico (Matthews & Jenks, 2013). A administração oral desta bactéria em ratos demonstrou ser responsável por uma melhoria da aprendizagem e da memória, uma vez que os ratos conseguiram executar as diferentes funções mais rapidamente que o grupo controlo, percorrendo um labirinto mais depressa e com menos erros. Estes resultados mostram o impacto positivo que certos microrganismos ambientais podem ter na modulação do comportamento animal.

Por outro lado, mudanças na dieta provocam modificações na microbiota intestinal, melhorando o desempenho dos animais nas tarefas cognitivas (Li, Dowd, Scurlock, Acosta-Martinez, & Lyte, 2009). Estes autores referem que a adição de carne magra à dieta dos roedores induz um aumento na diversidade de bactérias da microbiota (cerca de 12 géneros encontraram-se unicamente nos animais com esta dieta, enquanto apenas 3 géneros eram exclusivos dos animais com a dieta normal), o que se refletiu num aumento da memória de trabalho e da memória de referência.

Os ratos diabéticos possuem perturbações de memória e aprendizagem devido a alterações na plasticidade sináptica do hipocampo e ao *stress* oxidativo (Tuzcu & Baydas, 2006). O tratamento destes ratos com uma mistura de probióticos – *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus fermentum* – demonstrou melhorar a memória e aprendizagem, observando-se que os ratos diabéticos tratados com esta mistura de probióticos foram capazes de encontrar a plataforma presente no labirinto de água de Morris significativamente mais depressa do que sem a influência dos probióticos, tendo uma capacidade de aprendizagem e de memorização semelhante à dos ratos controlo saudáveis (Davari, Talaei, Alaei, & Salami, 2013). Os estudos em humanos demonstrativos destas mesmas evidências ainda são limitados, contudo já se comprovou que o consumo de probióticos por indivíduos saudáveis pode alterar a atividade funcional das áreas do cérebro envolvidas em funções cognitivas (Tillish et al., 2013).

2.3.3 Depressão

A depressão é uma doença bastante comum nos dias de hoje que prejudica grandemente a vida diária dos doentes. É uma doença recorrente e uma das principais causas de incapacidade a nível mundial (Moussavi et al., 2007).

Esta doença está associada a um aumento das citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Estas são potentes moduladores do CRF que vai ativar o eixo HPA (O'Brien, Scott, & Dinan, 2004). Ocorre então maior libertação de ACTH e cortisol, hormonas que também se encontram em níveis mais elevados na depressão major. Uma vez que os microrganismos intestinais influenciam o funcionamento do eixo HPA, bem como o sistema imunitário, poder-se-á perceber assim que a microbiota intestinal se encontra relacionado com a depressão, tal como referem Dinan e Cryan (2013).

Por outro lado, induzindo depressão em ratos através da realização de bulbectomia olfatória, observou-se que a microbiota intestinal destes ratos se diferenciava da microbiota dos ratos controlo sobretudo a nível da proporção de certos filos (Park et al., 2013). Isto é, ocorreu uma redistribuição da abundância relativa dos filos das bactérias nos ratos com depressão. Contudo, estes autores não realizaram nenhum teste para identificar esses filos. Neste mesmo trabalho foi ainda confirmado que as modificações na microbiota intestinal e no comportamento foram acompanhadas por um aumento dos níveis de CRF, o que é sugestivo da atividade aumentada do eixo HPA nos ratos que sofreram bulbectomia.

É importante salientar que estes dados ainda são contraditórios em pacientes humanos com depressão. Naseribafrouei et al. (2014) não detetaram diferenças significativas entre a microbiota dos pacientes com depressão e dos indivíduos saudáveis. Porém, num estudo realizado posteriormente por Jiang et al. (2015) onde também se comparou a composição da microbiota intestinal de indivíduos com depressão e indivíduos saudáveis, identificaram-se diversas diferenças entre os dois grupos. Os pacientes com depressão apresentaram um aumento na população de Bacteroidetes e Proteobacteria e uma diminuição da população de Firmicutes.

Mas existem outras evidências desta relação da microbiota com a depressão. No estudo realizado por Messaoudi et al. (2011) foram administrados dois probióticos -

Lactobacillus helveticus e *Bifidobacterium longum*, tanto em humanos como animais. Esta mistura de probióticos provocou uma diminuição da ansiedade nos ratos, enquanto os indivíduos saudáveis reportaram uma diminuição nos sintomas de depressão ou ansiedade que surgem com as situações quotidianas (Messaoudi et al., 2011).

Estes mesmos probióticos também foram utilizados em modelos de depressão no seguimento de enfarte do miocárdio, tendo-se verificado uma redução dos sintomas de depressão e uma melhoria no comportamento dos animais, provavelmente através da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da permeabilidade intestinal (Arseneault-Bréard et al., 2012; Gilbert et al., 2013).

Bravo et al. (2011) verificaram que a administração do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* em ratos diminuiu o seu comportamento ansioso e depressivo, sendo este último avaliado através do teste de natação forçada (*forced swim test*) onde se observou que os animais alimentados com este probióticos passavam muito menos tempo imóveis. Também se verificou que *L. rhamnosus* induziu alterações no GABA mRNA o que pode explicar a diminuição do comportamento depressivo e ansioso, já que alterações na expressão do GABA estão relacionadas com a patogénese da depressão e da ansiedade.

A utilização de minociclina, um antibiótico que por essa razão reduz a diversidade da microbiota, quando administrado conjuntamente com antidepressivos demonstrou melhorar significativamente a depressão e os sintomas psicóticos em pacientes com depressão psicótica (Miyaoaka et al., 2012). O mesmo se verificou com a doxiciclina que demonstrou efeitos semelhantes num estudo pré-clínico, tendo-se observado que os animais apresentavam uma diminuição dos sintomas depressivos após a administração deste antibiótico (Mello et al., 2013).

Embora já haja alguma diversidade de trabalhos acerca da depressão e sua relação com a microbiota intestinal, os que se aplicam ao ser humano são ainda escassos, sendo necessário estudar mais aprofundadamente as complexas interações entre as diferentes comunidades bacterianas residentes na microbiota intestinal e o desenvolvimento de alterações comportamentais, sobretudo depressão (O'Mahony et al., 2015).

2.3.4 Autismo

As desordens do espectro autista consistem em distúrbios neurológicos que se caracterizam por comprometimento das interações sociais e comunicação, tanto verbal como não-verbal, e pela presença de comportamentos repetitivos e restritos (de Theije et al., 2011). Deste grupo fazem parte o autismo, a síndrome de Asperger e o transtorno global do desenvolvimento sem outra especificação, embora geralmente apenas se utilize a designação autismo (Johnson, Myers, & The Council on Children With Disabilities, 2007). Embora ainda não se saiba ao certo o que causa esta doença, pensa-se que o seu aparecimento é sobretudo devido a causas genéticas (Johnson et al., 2007). Contudo, também fatores ambientais, como exposição a químicos e drogas ou poluição do ar, na altura pré ou pós-natal, a idade avançada dos progenitores, o *stress*, infeções da mãe e dieta podem contribuir para o desenvolvimento deste síndrome como representado na figura 7, sendo provável que este ocorra devido à combinação de fatores (Dietert, Dietert, & DeWitt, 2011; Johnson et al., 2007).

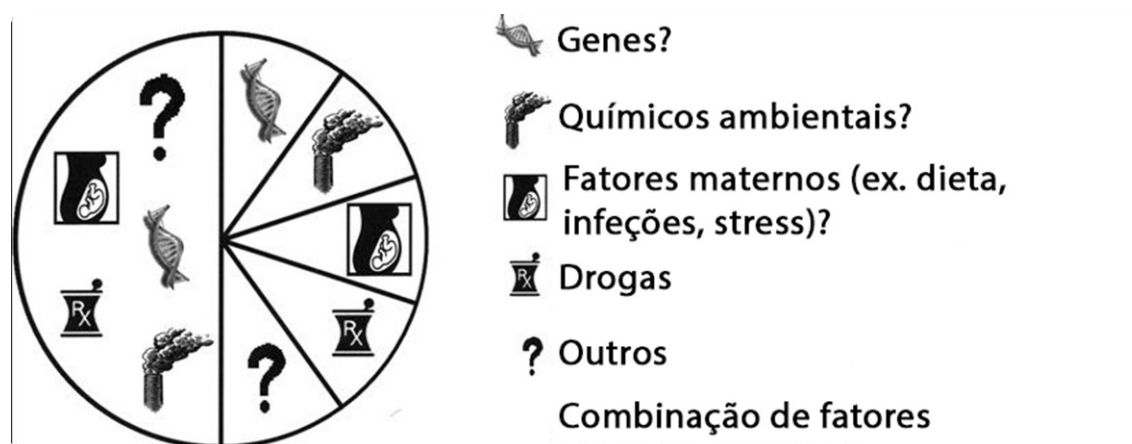


Figura 7 - Possíveis fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de autismo (adaptado de Dietert et al., 2011)

Sintomas gastrointestinais como diarreia, obstipação, flatulência ou desconforto abdominal, são bastante comuns em crianças com autismo e podem estar associados ao grau de severidade da doença (Adams, Johansen, Powell, Quig, & Rubin, 2011; de Theije et al., 2011). O facto de estes sintomas serem tão comuns nestas crianças pode significar que os distúrbios gastrointestinais, provavelmente resultantes de alterações na

composição da microbiota intestinal, tenham uma relação com o desenvolvimento de autismo (de Theije et al., 2011).

Com o objetivo de estudar estes sintomas e a sua relação com esta doença Hsiao et al. (2013) compararam a microbiota intestinal de animais com autismo com animais saudáveis. Detetaram nos ratos autistas alterações semelhantes às que se encontram em pacientes humanos com autismo, sendo que as maiores modificações se encontravam nas bactérias pertencente ao filo Firmicutes que sofreram um aumento e do filo Bacteroidetes que diminuíram, observação comprovada por de Theije et al. (2014). Para além da disbiose da microbiota comensal, estes animais exibiam uma barreira intestinal deficiente. O tratamento com *Bacterioides fragilis*, um comensal humano, corrigiu as deficiências a nível da barreira intestinal, restaurou a composição normal da microbiota intestinal e diminuiu consideravelmente os comportamentos típicos de autismo (Hsiao et al., 2013).

Estudos com crianças com autismo também identificaram alterações na composição da microbiota intestinal de crianças com autismo em comparação com a microbiota de crianças saudáveis. Tanto Finegold et al. (2002) como Parracho, Bingham, Gibson e McCartney (2005) observaram que as crianças com autismo apresentavam nas suas fezes mais espécies de *Clostridium* (pertencente ao filo Firmicutes), sendo a incidência de *Clostridium histolyticum* superior quando comparado com a microbiota das crianças saudáveis. Foi ainda identificada uma relação entre os níveis de *Clostridium histolyticum* e os sintomas gastrointestinais, uma vez que as crianças com sintomas gastrointestinais mais graves eram as que apresentavam concentrações superiores desta bactéria (Parracho et al., 2005).

À semelhança das observações em animais, também Finegold et al. (2010) verificaram que nas crianças autistas predominavam as bactérias do filo Bacteroidetes, em oposição às crianças saudáveis, cujo filo predominante é o filo Firmicutes. Por outro lado, as crianças autistas também possuem níveis mais elevados de *Lactobacillus* (pertencente ao filo Firmicutes) e níveis inferiores de *Bifidobacterium* (pertencente ao filo Actinobacteria) e *Enterococcus* (pertencente ao filo Firmicutes) (Adams et al., 2011).

Contudo, é importante ter em consideração que indivíduos com autismo frequentemente recorrem à utilização de antibióticos, bem como seguem dietas

específicas, ambos fatores que podem introduzir modificações na microbiota intestinal (Cryan & Dinan, 2012).

Para além do estudo da composição da microbiota intestinal, também se identificou que as crianças autistas apresentam concentrações mais elevadas de ácidos gordos de cadeia curta nas fezes (L. Wang et al., 2012). Uma vez que estes metabolitos são substância neuroativas, a alteração na sua produção poderá ter impacto no cérebro podendo ser este o mecanismo responsável pelo desenvolvimento de autismo (Cryan & Dinan, 2012). A injeção intracerebroventricular de doses relativamente elevadas de ácido propiónico em ratos provoca o aparecimento de alterações a nível do desenvolvimento social e comportamental, semelhantes aos observados em pacientes com autismo (MacFabe et al., 2011; Shultz et al., 2008, 2009).

Tendo por base o conhecimento de que os sintomas gastrointestinais são bastante comuns em crianças autistas e que a sua microbiota poderá então, estar alterada, testou-se o impacto da administração de um antibiótico minimamente absorvido – vancomicina, tendo-se observado uma melhoria nos sintomas gastrointestinais mas também no comportamento autista destas crianças (Sandler et al., 2000).

Embora já haja vários estudos sobre o autismo, é necessário perceber se esta síndrome provoca a disbiose intestinal ou se as alterações a nível da flora intestinal é que são responsáveis pelo desenvolvimento do autismo ou dos seus sintomas (Finegold et al., 2010).

2.3.5 Esquizofrenia

De acordo com o National Institute of Mental Health a esquizofrenia define-se como um distúrbio mental, crónico e severo, que afeta os pensamentos, sentimentos e comportamentos de forma bastante debilitante. As suas causas não são ainda totalmente conhecidas, embora se saiba que existam fatores genéticos que podem estar envolvidas no seu desenvolvimento (Nemani, Hosseini Ghomi, McCormick, & Fan, 2015).

Até à data são poucos os estudos acerca da relação entre a microbiota e a esquizofrenia, contudo vários fatores de risco para o desenvolvimento de esquizofrenia podem estar associados ao trato gastrointestinal (Nemani et al., 2015).

Pensa-se que a hipofunção do recetor NMDA está relacionada com a fisiopatologia da esquizofrenia, uma vez que se observou que antagonistas do recetor NMDA produzem sintomas semelhantes aos presentes nesta patologia. Por outro lado, agentes que aumentam a função deste recetor são capazes de reduzir os sintomas e melhorar a cognição em doentes com esquizofrenia (Coyle, 2012). Os recetores NMDA são um tipo de recetores do glutamato que se encontram envolvidos no controlo de diversas funções da neurotransmissão, tal como plasticidade sináptica ou memória (Nemani et al., 2015). Também alterações na expressão do BDNF podem ter um papel no desenvolvimento das disfunções cognitivas presentes na esquizofrenia (Nieto, Kukuljan, & Silva, 2013). O BDNF encontra-se envolvido na neurogénese e plasticidade cerebral (Nemani et al., 2015). Dado que o desenvolvimento de uma microbiota intestinal normal é importante para estimular a plasticidade cerebral, estando a correta expressão do BDNF e dos recetores NMDA intimamente ligados ao correto funcionamento cerebral, a disbiose intestinal poderá ser um dos fatores responsáveis pela disfunção deste recetor e incorreta expressão de BDNF que se verifica na esquizofrenia (Nemani et al., 2015). Contudo estes dados são apenas suposições destes autores, visto ainda não haver estudos que comprovem esta ideia.

Nemani e colegas (2015) sugerem ainda outros mecanismos que podem explicar a existência de uma relação entre a microbiota intestinal e esta doença, estabelecendo uma possível relação entre os dois através da produção de citocinas. Os pacientes com esquizofrenia apresentam níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias do que indivíduos saudáveis (Kunz et al., 2011). Como a microbiota intestinal se encontra

envolvido na regulação das respostas imunitárias (Round et al., 2010) poderá existir alguma relação entre microbiota e esquizofrenia, mas mais uma vez trata-se de uma suposição destes autores. Por outro lado, realçam que desequilíbrios na flora intestinal podem levar ao aparecimento de síndrome metabólica e que os pacientes com esquizofrenia apresentam um risco mais elevado de desenvolver esta síndrome, por terem processos inflamatórios e imunitários bastante ativos.

Por último, os mesmos autores referem que ainda não existem estudos sobre a composição da microbiota intestinal de pacientes com esquizofrenia, existindo no entanto, alguns indícios de que este poderá estar alterado. Estes incluem um aumento dos marcadores de inflamação e um aumento na translocação bacteriana em doentes com esquizofrenia; o aumento das respostas imunitárias devido a agentes patogénicos infecciosos e antigénios alimentares; e o conhecimento de que a composição da microbiota intestinal se encontra modificada noutras doenças mentais.

2.3.6 Alzheimer

A doença de Alzheimer, também designada de demência senil ou desordem cognitiva, é uma doença degenerativa do SNC, progressiva e irreversível, bastante comum em idosos que resulta na deterioração de diversas funções cognitivas como memória, pensamento, linguagem e comportamento (Dubois et al., 2010; Hu, Wang, & Jin, 2016). Sabe-se que o desenvolvimento desta doença está relacionado com fatores genéticos diversos, idade avançada e história familiar, mas também os fatores ambientais podem ter um papel importante na mesma (Munoz & Feldman, 2000).

Muito recentemente Hu et al. (2016) publicaram um artigo onde procedem a uma revisão extensiva da relação entre a microbiota intestinal e a doença de Alzheimer. Estes autores sugerem diversos fatores e mecanismos que podem estar na base desta relação, tendo-se baseado nalguns estudos que já existem, nos efeitos da microbiota intestinal no eixo intestino-cérebro e no comportamento, bem como o papel da microbiota intestinal na patogénese de outras doenças mentais como a depressão, autismo ou Parkinson. Devido a estes indícios, estes autores pensam ser natural especular que exista uma relação entre o desequilíbrio da flora intestinal e a doença de Alzheimer.

Para Hu e colegas a primeira evidência de que a microbiota intestinal está relacionado com a doença de Alzheimer consiste no facto de alterações a nível da flora intestinal poderem provocar problemas na cognição, ao levarem a modificações no normal funcionamento do cérebro. Uma vez que a doença de Alzheimer se caracteriza por apresentar uma degeneração progressiva de diversas funções cognitivas e visto que a microbiota intestinal tem um papel importante na manutenção destas funções, este poderá estar associado ao desenvolvimento da doença de Alzheimer ou ter uma função importante na mesma.

Por outro lado, estes autores sugerem que poderá haver uma relação entre a dieta, a microbiota intestinal e a doença de Alzheimer, uma vez que se considera que a dieta se encontra fortemente relacionada com o desenvolvimento desta doença. Por exemplo, os ácidos gordos polinsaturados ómega 3 (em inglês – ω -3 PUFA) ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) são essenciais para o normal funcionamento do cérebro e funções neurais (Yehuda, Rabinovitz, & Mostofsky, 2005), sendo que níveis reduzidos deste ácido gordo no organismo se encontram associados a doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (Hu et al., 2016). Verificou-se que os pacientes

com doença de Alzheimer apresentam níveis significativamente mais reduzidos de DHA, comparativamente a indivíduos saudáveis (Tully et al., 2003) e sabe-se ainda que a ingestão de ω -3 PUFA através da dieta pode reduzir os riscos de desenvolvimento de Alzheimer (Morris et al., 2003), bem como desacelerar o declínio cognitivo relacionado com a própria idade (Solfrizzi et al., 2006). O principal local de absorção dos ácidos gordos é o intestino e, portanto, a absorção do ω -3 PUFA encontra-se dependente do estado em que o intestino se encontra. Isto é, caso o intestino se encontre fragilizado a absorção de substâncias como o DHA pode ser alterada. Num estudo realizado por Solakivi et al. (2011) verificou-se que doentes com IBS possuíam uma diminuição dos níveis de DHA por este ser menos absorvido, uma vez que o intestino destes doentes se encontra fragilizada. Adicionalmente também os ácidos gordos provenientes da dieta podem modular a composição da microbiota intestinal e influenciar o sistema imunitário do hospedeiro (Hu et al., 2016). Em ratos que foram alimentados com uma dieta enriquecida com ω -3 PUFA, verificou-se que a composição da sua microbiota foi alterada (Liu, Hougen, Vollmer, & Hiebert, 2012; Yu et al., 2014). Portanto por um lado o ω -3 PUFA pode alterar o funcionamento do cérebro, ao provocar modificações ao nível da composição da microbiota intestinal e por outro lado, uma microbiota intestinal equilibrado e um intestino saudável podem permitir uma melhor absorção do ω -3 PUFA proveniente da dieta, reduzindo o risco de desenvolvimento de doença de Alzheimer. Isto é, no caso de disbiose intestinal, a absorção de ω -3 PUFA fica comprometida e o risco de desenvolver Alzheimer fica significativamente aumentado (Hu et al., 2016).

Hu et al. (2016) referem também o impacto que a permeabilidade intestinal poderá ter na doença de Alzheimer. Os LPS ou endotoxinas provenientes das bactérias são capazes de induzir uma resposta inflamatória extensa, caso atravessem para a corrente sanguínea, contudo isso não acontece num organismo saudável pois os LPS ficam retidos na barreira intestinal. Quando esta barreira se encontra fragilizada a sua permeabilidade aumenta e dessa forma os LPS são capazes de atravessar para a corrente sanguínea e provocar inflamação. Assim, níveis elevados de LPS em circulação são sinónimo, não só de inflamação, mas também de uma barreira intestinal danificada (Hu et al., 2016). Um estudo realizado por Zhang et al. (2009) verificou que os pacientes com Alzheimer possuíam níveis mais elevados de LPS do que indivíduos saudáveis. Um outro marcador de inflamação, mais especificamente de inflamação intestinal, é a calprotectina fecal. Foi observado que os pacientes com Alzheimer também

apresentavam concentrações elevadas desta proteína nas fezes, sendo uma indicação do aumento de permeabilidade intestinal (Leblhuber, Geisler, Steiner, Fuchs, & Schütz, 2015). Tanto o aumento da concentração de calprotectina como de LPS são indicativas da existência de uma barreira intestinal disfuncional e de um aumento da permeabilidade intestinal e da inflamação, em pacientes com doença de Alzheimer, o que suporta a sugestão de que a microbiota intestinal participa na patogênese desta doença (Hu et al., 2016).

A última evidência direta da relação entre a microbiota e a doença de Alzheimer de acordo com estes autores, consiste no impacto que a microbiota intestinal tem na produção de neurotransmissores e no metabolismo. As bactérias presentes no intestino, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, produzem GABA através da metabolização do glutamato (Barrett et al., 2012). O GABA é um dos principais neurotransmissores e caso haja alguma desregulação neste sistema, poderão surgir danos na cognição (Lanctôt, Herrmann, Mazzotta, Khan, & Ingber, 2004). O aumento do GABA no trato gastrointestinal está relacionado com o aumento deste neurotransmissor no SNC, e desta forma uma alteração na composição bacteriana do intestino, sobretudo redução de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, vai provocar uma diminuição da produção de GABA no intestino, levando a uma diminuição das concentrações também no SNC (Hu et al., 2016). Foi observado que os doentes com Alzheimer possuíam níveis inferiores de GABA no córtex frontal, temporal e parietal (Lanctôt et al., 2004).

Estes são apenas alguns dos vários exemplos referidos por Hu e colegas (2016) para demonstrar a existência de uma possível relação entre a microbiota intestinal e a doença de Alzheimer, acrescentando ainda que a modulação da microbiota através de dieta personalizada, ou através de intervenções benéficas na microbiota, provavelmente tornar-se-ão no futuro, uma alternativa de tratamento nos distúrbios mentais como a doença de Alzheimer.

2.3.7 Parkinson

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa que se caracteriza pela acumulação e agregação da proteína alfa-sinucleína (α -syn), formando corpos de Lewy na substância negra no SNC e outras estruturas neurais (Braak et al., 2003; Dickson et al., 2009). A doença de Parkinson possui sintomas bastantes característicos como a bradicinesia, os tremores, a rigidez, instabilidade postural e alterações na marcha, que são o resultado da perda dos neurónios dopaminérgicos na substância negra (Dickson et al., 2009). No entanto, esta patologia manifesta-se também por sintomas não-motores, envolvendo o sistema olfatório, o sistema urogenital, cardiovascular e gastrointestinal (Bloch, Probst, Bissig, Adams, & Tolnay, 2006; Cersosimo et al., 2013).

De fato, as disfunções do trato gastrointestinal sobretudo obstipação, afetam a grande maioria dos doentes com Parkinson e podem surgir alguns anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas motores (Cersosimo et al., 2013; Scheperjans et al., 2015). Obstipação e trânsito intestinal mais lento estão associados a alterações neurodegenerativas no SNE (Cersosimo et al., 2013; Pfeiffer, 2011).

Scheperjans e colegas (2015), ao repararem que não existiam estudos que comparassem a composição da microbiota intestinal de doentes com Parkinson e indivíduos saudáveis, analisaram a flora intestinal de vários pacientes com Parkinson. Na sua opinião existem diversos indícios que podem explicar o envolvimento da microbiota intestinal na doença de Parkinson. Por um lado, a neurodegeneração do SNE relacionada com a α -syn é uma manifestação frequente desta doença precedendo os sintomas motores. Esta neurodegeneração está relacionada com a obstipação crónica e as alterações fisiopatológicas no epitélio intestinal. A microbiota intestinal influencia a atividade dos neurónios entéricos podendo, por isso, afetar a secreção celular de α -syn. A nível do SNC, mais especificamente nas estruturas que fornecem enervação parassimpática ao intestino, são frequentemente encontrados problemas relacionados com a α -syn. O nervo vago pode então ser o responsável pela transmissão de neuropatologias relacionadas com esta proteína, desde o SNE até ao SNC.

Estes autores procederam então à comparação das microbiotas intestinais de pacientes doentes e de indivíduos saudáveis, verificando que os doentes com Parkinson apresentavam uma redução na abundância de Prevotellaceae (pertencente ao filo

Bacteroidetes) e um aumento na abundância de Enterobacteriaceae (pertencente ao filo Proteobacteria). Os autores sugeriram que a diminuição de Prevotellaceae possa estar relacionada com diversos aspectos fisiopatológicos da doença, enquanto o aumento de Enterobacteriaceae se encontra positivamente relacionado com a severidade da instabilidade postural e dificuldades de marcha.

Este é um dos poucos estudos que existem sobre o papel da microbiota intestinal na patogênese da doença de Parkinson e, portanto é necessário realizar mais estudos de forma a compreender as relações temporais e causais entre a microbiota intestinal e a doença de Parkinson, bem como entender os mecanismos envolvidos nesta relação.

De forma a concluir este capítulo acerca das diferentes doenças penso ser importante referir que tal como Mu, Yang e Zhu (2016) salientam, de forma a compreender o potencial da manipulação da microbiota como opção no tratamento de doenças mentais, é importante perceber como estas doenças alteram a composição da microbiota intestinal, sendo também essencial entender se a microbiota é um fator causal para o desenvolvimento de distúrbios mentais. Caso seja, alguns membros da flora bacteriana intestinal, que sofrem alterações em doenças mentais, poderão ter um papel essencial na recuperação do equilíbrio da microbiota intestinal e na normalização do comportamento, funcionando como elementos terapêuticos.

2.4 Psicobióticos

Psicobiótico é um termo criado por Dinan, Stanton e Cryan (2013) para definir um organismo vivo que quando ingerido em quantidades adequadas, fornece um benefício à saúde de pacientes que sofrem de uma doença mental. Corresponde a uma classe de probióticos, sobretudo dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, capazes de produzir substâncias neuroativas, como GABA e serotonina, que atuam no eixo intestino-cérebro, tendo um efeito benéfico a nível do humor, ansiedade e cognição (Dinan et al., 2013).

Tal como já foi sendo referido ao longo do texto e uma vez que os psicobióticos são probióticos, a sua ingestão exerce um efeito positivo no humor e ansiedade de indivíduos saudáveis (Messaoudi et al., 2011), modula as funções do eixo HPA (Schmidt et al., 2015) e altera o funcionamento do cérebro (Tillish et al., 2013). Contudo estes dados surgem de modelos animais e ainda não existem estudos publicados acerca da utilização de probióticos em doentes clinicamente deprimidos e portanto, recomendações específicas acerca da sua aplicação ainda não existem, embora a sua aplicação no tratamento destes doentes seja promissora (Dinan et al., 2013; Kelly, Clarke, Cryan, & Dinan, 2016).

Conclusão

Os microrganismos residentes no trato gastrointestinal humano constituem uma comunidade dinâmica, que se adquire nos primeiros tempos de vida e que se vai alterando ao longo da vida do indivíduo, dependendo do seu estilo de vida, alimentação ou estado de saúde.

A microbiota intestinal participa em diversas funções, nomeadamente no desenvolvimento do sistema imunitário, na absorção de nutrientes, na proteção contra lesões no epitélio intestinal ou contra xenobióticos, possibilitando a manutenção da homeostase para além de ter um papel importante na comunicação entre o intestino e o cérebro.

Existem cada vez mais trabalhos experimentais que suportam a existência de uma comunicação bidirecional ao longo do eixo microbiota-intestino-cérebro e demonstram que a microbiota intestinal influencia o funcionamento do SNC, controlando diversos aspetos fundamentais do cérebro e do comportamento, na saúde e na doença. Esta comunicação ocorre através de diferentes mecanismos, que envolvem as vias endócrina, neural e imunitária, quer direta quer indiretamente.

São muitas as evidências que verificam que o *stress* altera a composição da microbiota intestinal e que, alterações nesta comunidade estão associadas a modificações no comportamento. Surgem desta forma distúrbios como a ansiedade, depressão ou outras doenças do foro mental, tais como esquizofrenia, autismo, Parkinson ou Alzheimer.

De forma a estudar-se o papel da microbiota na manutenção da saúde e no desenvolvimento da doença, pode-se recorrer a diferentes estratégias, no entanto, a maioria dos trabalhos recorre a estudos com roedores. Embora já comecem a surgir várias pesquisas com humanos, torna-se importante validar as descobertas observadas nos estudos animais, em humanos, para que se possa melhor compreender como a disbiose intestinal afeta a saúde mental. Assim, poder-se-ão desenvolver abordagens terapêuticas inovadoras para a prevenção ou tratamento de desordens mentais.

É também importante elucidar os mecanismos através dos quais a comunidade bacteriana residente no intestino, comunica com o eixo intestino-cérebro, na tentativa de se compreender se as alterações da microbiota comensal funcionam como causa do

aparecimento de doenças neuropsiquiátricas ou se, por outro lado, são uma consequência dessas mesmas patologias.

É necessário ainda investigar o papel da microbiota intestinal em patologias específicas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, uma vez que são doenças que cada vez mais afetam um maior número de pessoas na sociedade moderna, e para as quais são precisas opções terapêuticas alternativas às existentes, que ajudem na sua prevenção ou combatam a progressão das mesmas. Também mais investigação acerca da esquizofrenia é necessária, visto que ainda muito pouco se sabe sobre esta doença e sobre o impacto da microbiota na mesma.

No seguimento destas ideias, a utilização de substâncias como os psicobióticos para tratamento de doenças mentais, é uma oportunidade que não deve ser esquecida e, portanto, que deve ser mais estudada no futuro.

Na minha opinião, como a temática do eixo microbiota-intestino-cérebro é tão vasta ainda há muito para descobrir e compreender melhor. Penso que muitos avanços serão conseguidos no futuro próximo por ser um tema tão falado na atualidade e devido à sua importância. A possibilidade de utilizar a manipulação da microbiota intestinal como opção terapêutica, através de substâncias como probióticos que poderão, quem sabe, ser ingeridos através de um simples iogurte diariamente, é uma perspetiva fascinante. Tendo em conta que as terapêuticas existentes hoje em dia para tratar doenças mentais como Alzheimer, Parkinson ou até mesmo a depressão, nem sempre fornecem tantas vantagens aos doentes como seria desejável, tendo bastantes efeitos adversos, é realmente importante procurar alternativas mais benéficas.

Bibliografia

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2015). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.*, *6*(237), 237ra65. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D., & Rubin, R. a. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterology*, *11*, 22. <http://doi.org/10.1186/1471-230X-11-22>
- Agans, R., Rigsbee, L., Kenche, H., Michail, S., Khamis, H. J., & Paliy, O. (2011). Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS Microbiology Ecology*, *77*(2), 404–412. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01120.x>
- Arseneault-Bréard, J., Rondeau, I., Gilbert, K., Girard, S.-A., Tompkins, T. A., Godbout, R., & Rousseau, G. (2012). Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *British Journal of Nutrition*, *107*(12), 1793–1799. <http://doi.org/10.1017/S0007114511005137>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Yamada, T., Mende, D. R., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, *473*(7346), 174–180. <http://doi.org/10.1038/nature09944>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V, Koh, G. Y., Nagy, A., ... Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15718–15723. <http://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, *307*(5717), 1915–1920. <http://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Bakken, J. S., Borody, T., Brandt, L. J., Brill, J. V., Demarco, D. C., Franzos, M. A., ... Surawicz, C. (2011). Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *9*(12), 1044–1049. <http://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.08.014>
- Barrett, E., Kerr, C., Murphy, K., O’Sullivan, O., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., ... Stanton, C. (2013). The individual-specific and diverse nature of the preterm infant

- microbiota. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 98, F334–F340. <http://doi.org/10.1136/archdischild-2012-303035>
- Barrett, E., Ross, R. P., O’Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 411–417. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x>
- Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T., & Mcmurdo, M. E. T. (2004). Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3575–3581. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004>
- Bercik, P., Collins, S. M., & Verdu, E. F. (2012). Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterology and Motility*, 24(5), 405–413. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01906.x>
- Bercik, P., Verdu, E. F., Foster, J. A., MacRi, J., Potter, M., Huang, X., ... Collins, S. M. (2010). Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. *Gastroenterology*, 139(6), 2102–2112. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.063>
- Bergström, A., Skov, T. H., Bahl, M. I., Roager, H. M., Christensen, L. B., Ejlerskov, K. T., ... Licht, T. R. (2014). Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), 2889–2900. <http://doi.org/10.1128/AEM.00342-14>
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., & Retetangos, C. (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development*, 86(SUPPL. 1), 13–15. <http://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004>
- Bloch, A., Probst, A., Bissig, H., Adams, H., & Tolnay, M. (2006). α -Synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 32(3), 284–295. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00727.x>
- Borre, Y. E., O’Keeffe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20(9), 509–518.

- <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.05.002>
- Bourassa, M. W., Alim, I., Bultman, S. J., & Ratan, R. R. (2016). Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: can a high fiber diet improve brain health? *Neuroscience Letters*, *625*, 56–63. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.009>
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197–211. [http://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](http://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V, Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., ... Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(38), 16050–16055. <http://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Burke, H. M., Davis, M. C., Otte, C., & Mohr, D. C. (2005). Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, *30*(9), 846–856. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.02.010>
- Cersosimo, M. G., Raina, G. B., Pecci, C., Pellene, A., Calandra, C. R., Gutiérrez, C., ... Benarroch, E. E. (2013). Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *Journal of Neurology*, *260*(5), 1332–1338. <http://doi.org/10.1007/s00415-012-6801-2>
- Chakravarty, S., & Herkenham, M. (2005). Toll-Like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *Journal of Neuroscience*, *25*(7), 1788–1796. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4268-04.2005>
- Chen, X., D'Souza, R., & Hong, S. T. (2013). The role of gut microbiota in the gut-brain axis: current challenges and perspectives. *Protein and Cell*, *4*(6), 403–414. <http://doi.org/10.1007/s13238-013-3017-x>
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, *267*(9), 1244–1252. <http://doi.org/10.1001/jama.267.9.1244>
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., ... O'Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 108(Suppl. 1), 4586–4591.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O’Connor, E. M., ..., & O’Toole, P. W. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488, 178–184. <http://doi.org/10.1038/nature11319>
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., ... Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, 18(6), 666–673. <http://doi.org/10.1038/mp.2012.77>
- Coyle, J. T. (2012). NMDA receptor and schizophrenia: a brief history. *Schizophrenia Bulletin*, 38(5), 920–926. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbs076>
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(10), 701–712. <http://doi.org/10.1038/nrn3346>
- Davari, S., Talaei, S. A., Alaei, H., & Salami, M. (2013). Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis. *Neuroscience*, 240, 287–296. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.055>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., ... Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <http://doi.org/10.1038/nature12820>.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., ... Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14691–14696. <http://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- De Palma, G., Blennerhassett, P., Lu, J., Deng, Y., Park, a. J., Green, W., ... Bercik, P. (2015). Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature Communications*, 6, 7735. <http://doi.org/10.1038/ncomms8735>
- de Theije, C. G. M., Wopereis, H., Ramadan, M., van Eijndthoven, T., Lambert, J., Knol, J., ... Oozeer, R. (2014). Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 197–206. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.005>

- de Theije, C. G. M., Wu, J., Da Silva, S. L., Kamphuis, P. J., Garssen, J., Korte, S. M., & Kraneveld, A. D. (2011). Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *European Journal of Pharmacology*, 668(SUPPL. 1), S70–S80. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.013>
- Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O’Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R. D., ... Cryan, J. F. (2015). Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: implications for brain and behaviour. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 165–173. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.004>
- Dickson, D. W., Fujishiro, H., Orr, C., DelleDonne, A., Josephs, K. A., Frigerio, R., ... Ahlskog, J. E. (2009). Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 15(SUPPL. 3), S1–S5. [http://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70769-2](http://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70769-2)
- Dicksved, J., Schreiber, O., Willing, B., Petersson, J., Rang, S., Phillipson, M., ... Roos, S. (2012). *Lactobacillus reuteri* maintains a functional mucosal barrier during DSS treatment despite mucus layer dysfunction. *PLoS ONE*, 7(9), e46399. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046399>
- Dietert, R. R., Dietert, J. M., & DeWitt, J. C. (2011). Environmental risk factors for autism. *Emerging Health Threats Journal*, 4, 7111. <http://doi.org/10.3402/ehj.v4i0.7111>
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterology and Motility*, 25(9), 713–719. <http://doi.org/10.1111/nmo.12198>
- Dinan, T. G., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biological Psychiatry*, 74(10), 720–726. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975. <http://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Cummings, J. L., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., ... Scheltens, P. (2010). Revising the definition of Alzheimer’s disease: a new lexicon. *The Lancet Neurology*, 9(11), 1118–1127.

- [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70223-4](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70223-4)
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., ... Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, *308*(5728), 1635–1638. <http://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Eloe-Fadros, E. A., & Rasko, D. A. (2013). The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, *64*, 145–163. <http://doi.org/10.1146/annurev-med-010312-133513>
- Fallani, M., Amarri, S., Uusijarvi, A., Adam, R., Khanna, S., Aguilera, M., ... Edwards, C. A. (2011). Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology*, *157*(Pt 5), 1385–1392. <http://doi.org/10.1099/mic.0.042143-0>
- Fan, W., Huo, G., Li, X., Yang, L., & Duan, C. (2014). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in infants during the first six months of life. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(2), 133–143. <http://doi.org/10.4014/jmb.1309.09029>
- Feltis, B. A., Kim, A. S., Kinneberg, K. M., Lyerly, D. L., Wilkins, T. D., Erlandsen, S. L., & Wells, C. L. (1999). *Clostridium difficile* toxins may augment bacterial penetration of intestinal epithelium. *Archives of Surgery*, *134*(11), 1235–1242. <http://doi.org/10.1001/archsurg.134.11.1235>
- Finegold, S. M., Dowd, S. E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K. E., Wolcott, R. D., ... Green, J. A. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, *16*(4), 444–453. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008>
- Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M.-L., Bolte, E., ... Kaul, A. (2002). Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical Infectious Diseases*, *35*(Suppl 1), S6–S16. <http://doi.org/10.1086/341914>
- Forsythe, P., & Kunze, W. A. (2013). Voices from within: gut microbes and the CNS. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(1), 55–69. <http://doi.org/10.1007/s00018-012-1028-z>
- Frazer, A., & Hensler, J. G. (1999). Serotonin involvement in physiological function and behavior. In G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, S. K. Fisher, & M. D. Uhler (Eds.), *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects* (6th editio). Philadelphia: Lippincott-Raven. Retirado de

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27940/>
- Funkhouser, L. J., & Bordenstein, S. R. (2013). Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biology*, *11*(8), e1001631. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001631>
- Gareau, M. G., Silva, M. A., & Perdue, M. H. (2008). Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Corrent Molecular Medicine*, *8*(4), 274–281. <http://doi.org/10.2174/156652408784533760>
- Gareau, M. G., Wine, E., Rodrigues, D. M., Cho, J. H., Whary, M. T., Philpott, D. J., ... Sherman, P. M. (2011). Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut*, *60*(3), 307–317. <http://doi.org/10.1136/gut.2009.202515>
- Genetic Science Learning Center. (2014). How we study the microbiome. Retirado de <http://learn.genetics.utah.edu/content/microbiome/study/>
- Gilbert, K., Arseneault-Bréard, J., Monaco, F. F., Beaudoin, A., Bah, T. M., Tompkins, T. A., ... Rousseau, G. (2013). Attenuation of post-myocardial infarction depression in rats by n-3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion. *British Journal of Nutrition*, *109*(1), 50–56. <http://doi.org/10.1017/S0007114512003807>
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., ... Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, *312*(5778), 1355–1359. <http://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P. A., Opitz, N., Reddaway, R., Badr, N., & Lyte, M. (2005). Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain, Behavior, and Immunity*, *19*(4), 334–344. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.09.002>
- Goehler, L. E., Park, S. M., Opitz, N., Lyte, M., & Gaykema, R. P. A. (2008). *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. *Brain, Behaviour, and Immunity*, *22*(3), 354–366. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.08.009>
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology*, *2*, 94. <http://doi.org/10.3389/fphys.2011.00094>
- Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B. S., & Guandalini, S. (2000). Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label

- study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 31(4), 453–457.
<http://doi.org/10.1097/00005176-200010000-00024>
- Hasselmo, M. E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(6), 710–715.
<http://doi.org/10.1016/j.conb.2006.09.002>
- Hecht, G., Pothoulakis, C., LaMont, J. T., & Madara, J. L. (1988). *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *Journal of Clinical Investigation*, 82(5), 1516–1524. <http://doi.org/10.1172/JCI113760>
- Hejtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., ... Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3047–3052.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
- Hooper, L. V., & Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews. Immunology*, 10(3), 159–169. <http://doi.org/10.1038/nri2710>
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291(5505), 881–884.
<http://doi.org/10.1126/science.291.5505.881>
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., Mccue, T., ... Mazmanian, S. K. (2013). The microbiota modulates gut physiology and behavioural abnormalities associated with autism. *Cell*, 155(7), 1451–1463.
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>
- Hu, X., Wang, T., & Jin, F. (2016). Alzheimer’s disease and gut microbiota. *Science China Life Sciences*. <http://doi.org/10.1007/s11427-016-5083-9>
- Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., & Caron, M. G. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35(11), 1503–1519.
[http://doi.org/10.1016/S0028-3908\(96\)00100-1](http://doi.org/10.1016/S0028-3908(96)00100-1)
- Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., ... Ruan, B. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 186–194. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.016>
- Johnson, C. P., Myers, S. M., & The Council on Children With Disabilities. (2007). Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders.

- Pediatrics*, 120(5), 1183–1215. <http://doi.org/10.1542/peds.2007-2361>
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., & Núñez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*, 14(7), 685–690. <http://doi.org/10.1038/ni.2608>.
- Kelly, J. R., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2016). Brain-gut-microbiota axis: challenges for translation in psychiatry. *Annals of Epidemiology*, 26(5), 366–372. <http://doi.org/10.1016/j.annepidem.2016.02.008>
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., ... Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Suppl 1), 4578–4585. <http://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>
- Kunz, M., Ceresér, K. M., Goi, P. D., Fries, G. R., Teixeira, A. L., Fernandes, B. S., ... Gama, C. S. (2011). Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 33(3), 268–274. <http://doi.org/10.1590/S1516-44462011000300010>
- Lanctôt, K. L., Herrmann, N., Mazzotta, P., Khan, L. R., & Ingber, N. (2004). GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne de Psychiatrie*, 49(7), 439–453. <http://doi.org/10.1177/070674370404900705>
- Leblhuber, F., Geisler, S., Steiner, K., Fuchs, D., & Schütz, B. (2015). Elevated fecal calprotectin in patients with Alzheimer's dementia indicates leaky gut. *Journal of Neural Transmission*, 122(9), 1319–1322. <http://doi.org/10.1007/s00702-015-1381-9>
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837–848. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
- Li, W., Dowd, S. E., Scurlock, B., Acosta-Martinez, V., & Lyte, M. (2009). Memory and learning behavior in mice is temporally associated with diet-induced alterations in gut bacteria. *Physiology and Behavior*, 96(4–5), 557–567. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.12.004>
- Liu, T., Hougen, H., Vollmer, A. C., & Hiebert, S. M. (2012). Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of

- dietary fatty acids. *Anaerobe*, 18(3), 331–337.
<http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.02.004>
- Lozupone, C., Stombaugh, J., Gordon, J., Jansson, J., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, 220–30.
<http://doi.org/10.1038/nature11550>
- Luckey, T. (1972). Introduction to intestinal microecology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25(12), 1292–1294.
- Lyte, M. (2011). Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays*, 33(8), 574–581. <http://doi.org/10.1002/bies.201100024>
- Lyte, M., Li, W., Opitz, N., Gaykema, R. P. A., & Goehler, L. E. (2006). Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. *Physiology and Behavior*, 89(3), 350–357. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.06.019>
- Lyte, M., Varcoe, J. J., & Bailey, M. T. (1998). Anxiogenic effect of subclinical bacterial infection in mice in the absence of overt immune activation. *Physiology and Behavior*, 65(1), 63–68. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00145-0](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00145-0)
- MacFabe, D. F., Cain, N. E., Boon, F., Ossenkopp, K. P., & Cain, D. P. (2011). Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: relevance to autism spectrum disorder. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 47–54.
<http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.005>
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67–72.
<http://doi.org/10.1079/PNS2002207>
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., ... De Simone, C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 121(3), 580–591.
<http://doi.org/10.1053/gast.2001.27224>
- Matthews, D. M., & Jenks, S. M. (2013). Ingestion of *Mycobacterium vaccae* decreases anxiety-related behavior and improves learning in mice. *Behavioural Processes*, 96, 27–35. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.02.007>
- Mayer, E. A., Knight, R., Mazmanian, S. K., Cryan, J. F., & Tillisch, K. (2014). Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *The Journal of*

- Neuroscience*, 34(46), 15490–15496. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3299-14.2014>
- Mello, B. S. F., Monte, A. S., McIntyre, R. S., Soczynska, J. K., Custódio, C. S., Cordeiro, R. C., ... Macêdo, D. S. (2013). Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. *Journal of Psychiatric Research*, 47(10), 1521–1529. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.06.008>
- Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., ... Cazaubiel. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *The British Journal of Nutrition*, 105(5), 755–764. <http://doi.org/10.1017/S0007114510004319>
- Miyaoka, T., Wake, R., Furuya, M., Liaury, K., Ieda, M., Kawakami, K., ... Horiguchi, J. (2012). Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: an open-label study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 37(2), 222–226. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.02.002>
- Montiel-Castro, A. J., González-Cervantes, R. M., Bravo-Ruiseco, G., & Pacheco-López, G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 1–16. <http://doi.org/10.3389/fnint.2013.00070>
- Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Wilson, R. S., ... Schneider, J. (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 60(7), 940–946. <http://doi.org/10.1001/archneur.60.7.940>
- Moussavi, S., Chatterji, S., Verdes, E., Tandon, A., Patel, V., & Ustun, B. (2007). Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet*, 370(9590), 851–858. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61415-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61415-9)
- Mu, C., Yang, Y., & Zhu, W. (2016). Gut microbiota: the brain peacekeeper. *Frontiers in Microbiology*, 7, 345. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00345>
- Munoz, D. G., & Feldman, H. (2000). Causes of Alzheimer's disease. *CMAJ*, 162(1), 65–72. <http://doi.org/10.1108/09526860010336984>
- Naseribafrouei, A., Hestad, K., Avershina, E., Sekelja, M., Linlökken, A., Wilson, R., & Rudi, K. (2014). Correlation between the human fecal microbiota and depression.

- Neurogastroenterology and Motility*, 26(8), 1155–1162.
<http://doi.org/10.1111/nmo.12378>
- Nemani, K., Hosseini Ghomi, R., McCormick, B., & Fan, X. (2015). Schizophrenia and the gut-brain axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 56, 155–160. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.08.018>
- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., & Foster, J. A. (2011a). Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Communicative & Integrative Biology*, 4(4), 492–494. <http://doi.org/10.4161/cib.4.4.15702>
- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., & Foster, J. A. (2011b). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility*, 23(3), 255-e119. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x>
- Nieto, R., Kukuljan, M., & Silva, H. (2013). BDNF and schizophrenia: from neurodevelopment to neuronal plasticity, learning, and memory. *Frontiers in Psychiatry*, 4, 45. <http://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00045>
- O'Brien, S. M., Scott, L. V., & Dinan, T. G. (2004). Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Human Psychopharmacology*, 19(6), 397–403. <http://doi.org/10.1002/hup.609>
- O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, 277, 32–48. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. M. P., Richter, J., Franke, A., ... Blumberg, R. S. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, 336(6080), 489–493. <http://doi.org/10.1126/science.1219328>.
- Park, A. J., Collins, J., Blennerhassett, P. A., Ghia, J. E., Verdu, E. F., Bercik, P., & Collins, S. M. (2013). Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression. *Neurogastroenterology and Motility*, 25(9), 733-e575. <http://doi.org/10.1111/nmo.12153>
- Parracho, H. M. R. T., Bingham, M. O., Gibson, G. R., & McCartney, A. L. (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology*, 54(Pt 10), 987–991. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.46101-0>
- Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2012). The vagus nerve and the inflammatory reflex—

- linking immunity and metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(12), 743–754. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2012.189>
- Perez-Burgos, A., Wang, B., Mao, Y.-K., Mistry, B., McVey Neufeld, K.-A., Bienenstock, J., & Kunze, W. (2013). Psychoactive bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304(2), G211–G220. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00128.2012>
- Persaud, R., Azad, M. B., Konya, T., Guttman, D. S., Chari, R. S., Sears, M. R., ... Kozyrskyj. (2014). Impact of perinatal antibiotic exposure on the infant gut microbiota at one year of age. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 10(Suppl 1), A31. <http://doi.org/10.1186/1710-1492-10-S1-A31>
- Pfeiffer, R. F. (2011). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 17(1), 10–15. <http://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.08.003>
- Qato, D. M., & Johnson, B. (2008). Use of prescription and over-the-counter medications and dietary supplements among older adults in the United States. *JAMA*, 300(24), 2867–2878. <http://doi.org/doi:10.1001/jama.2008.892>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59–65. <http://doi.org/10.1038/nature08821>
- Quigley, E. M. (2008). Probiotics in functional gastrointestinal disorders: what are the facts? *Current Opinion in Pharmacology*, 8(6), 704–708. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2008.08.007>
- Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G. H. J., Tims, S., Zoetendal, E. G., & De Vos, W. M. (2013). Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental Microbiology*, 15(4), 1146–1159. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.12023>
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229–241. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F. E., Heath, A. C., Rohwer, F., & Gordon, J. I. (2010). Viruses in the fecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, 466(7304), 334–338. <http://doi.org/10.1038/nature09199>

- Ringel-Kulka, T., Cheng, J., Ringel, Y., Salojärvi, J., Carroll, I., Palva, A., ... Satokari. (2013). Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults—a high throughput microarray analysis. *PLoS ONE*, 8(5), e64315. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0064315>
- Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L., & McCartney, A. L. (2010). Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology*, 156, 3329–3341. <http://doi.org/10.1099/mic.0.043224-0>
- Rogers, K. (2015). Norepinephrine. Retirado de <https://www.britannica.com/science/norepinephrine>
- Rosner, J. L. (2014). Ten times more microbial cells than body cells in humans? *Microbe*, 9(2), 47. Retirado de <http://blogs.plos.org/onscienceblogs/files/2014/10/HOW-MANY-HUMAN-MICROBES-Rosner.pdf>
- Round, J. L., O’Connell, R. M., & Mazmanian, S. K. (2010). Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. *Journal of Autoimmunity*, 34(3), J220–J225. <http://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.11.007>
- Saavedra, J. M. (2007). Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice*, 22(3), 351–365. <http://doi.org/10.1177/0115426507022003351>
- Sandler, R. H., Finegold, S. ., Bolte, E. R., Buchanan, C. P., Maxwell, A. P., Väisänen, M. L., ... Wexler, H. M. (2000). Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *Journal of Child Neurology*, 15(7), 429–35.
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., ... Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson’s disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, 30(3), 350–358. <http://doi.org/10.1002/mds.26069>
- Schmidt, K., Cowen, P. J., Harmer, C. J., Tzortzis, G., Errington, S., & Burnet, P. W. J. (2015). Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 232(10), 1793–1801. <http://doi.org/10.1007/s00213-014-3810-0>
- Schwartz, S., Friedberg, I., Ivanov, I. V, Davidson, L. A., Goldsby, J. S., Dahl, D. B., ... Chapkin, R. S. (2012). A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response.

- Genome Biology*, 13(4), r32. <http://doi.org/10.1186/gb-2012-13-4-r32>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology*, 14(8), e1002533. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Sherman, P. M., Ossa, J. C., & Johnson-Henry, K. (2009). Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutricion in Clinical Practice*, 24(1), 10–14. <http://doi.org/10.1177/0884533608329231>
- Shultz, S. R., MacFabe, D. F., Martin, S., Jackson, J., Taylor, R., Boon, F., ... Cain, D. P. (2009). Intracerebroventricular injections of the enteric bacterial metabolic product propionic acid impair cognition and sensorimotor ability in the Long-Evans rat: further development of a rodent model of autism. *Behavioural Brain Research*, 200(1), 33–41. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.023>
- Shultz, S. R., MacFabe, D. F., Ossenkopp, K. P., Scratch, S., Whelan, J., Taylor, R., & Cain, D. P. (2008). Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism. *Neuropharmacology*, 54(6), 901–911. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.01.013>
- Snyder, W. S., Cook, M. J., Nasset, E. S., Karhausen, L. R., Parry Howells, G., & Tripton, I. H. (1975). *Report of the task group on reference man*. Pergamon Press. Retirado de http://ani.sagepub.com/content/suppl/2013/06/25/os-23.1.DC2/P_023_1975_Report_on_the_Task_Group_on_Reference_Man_rev0.pdf
- Solakivi, T., Kaukinen, K., Kunnas, T., Lehtimäki, T., Mäki, M., & Nikkari, S. T. (2011). Serum fatty acid profile in subjects with irritable bowel syndrome. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 46(3), 299–303. <http://doi.org/10.3109/00365521.2010.533380>
- Solfrizzi, V., Colacicco, A. M., D’Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Rizzo, C., ... Panza, F. (2006). Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian longitudinal study on aging. *Neurobiology of Aging*, 27(11), 1694–1704. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.026>
- Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 529, 212–215. <http://doi.org/10.1038/nature16504>

- Stilling, R. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes, Brain and Behavior*, 13(1), 69–86. <http://doi.org/10.1111/gbb.12109>
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., ... Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *Journal of Physiology*, 558(Pt 1), 263–275. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
- Thomas, R. H., Meeking, M. M., Mepham, J. R., Tichenoff, L., Possmayer, F., Liu, S., & MacFabe, D. F. (2012). The enteric bacterial metabolite propionic acid alters brain and plasma phospholipid molecular species: further development of a rodent model of autism spectrum disorders. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 153. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-9-153>
- Tillish, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., ... Mayer, E. A. (2013). Consumption of fermented milk product with probiotics modulates brain activity. *Gastroenterology*, 144(7), 1394–1401, e1-4. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.043>
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53(4), 865–871. [http://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00429-4](http://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00429-4)
- Tully, A. M., Roche, H. M., Doyle, R., Fallon, C., Bruce, I., Lawlor, B., ... Gibney, M. J. (2003). Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *The British Journal of Nutrition*, 89(4), 483–489. <http://doi.org/10.1079/BJN2002804>
- Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 17), 4153–4158. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174136>
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., ... Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480–484. <http://doi.org/10.1038/nature07540>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-liggett, C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*, 449(7164), 804–810. <http://doi.org/10.1038/nature06244>
- Tuzcu, M., & Baydas, G. (2006). Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced

- learning and memory impairment in rats. *European Journal of Pharmacology*, 537(1–3), 106–110. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.03.024>
- van Noort, J. M., & Bsibsi, M. (2009). Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair. *Progress in Brain Research*, 175, 139–148. [http://doi.org/10.1016/S0079-6123\(09\)17509-X](http://doi.org/10.1016/S0079-6123(09)17509-X)
- Verdú, E. F., Bercik, P., Verma-Gandhu, M., Huang, X.-X., Blennerhassett, P., Jackson, W., ... Collins, S. M. (2006). Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut*, 55(2), 182–90. <http://doi.org/10.1136/gut.2005.066100>
- Verdu, E. F., & Collins, S. M. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Irritable bowel syndrome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 315–321. <http://doi.org/10.1053/ybega.2004.450>
- Victor, D. W. 3rd, & Quigley, E. M. (2014). Hepatic encephalopathy involves interactions among the microbiota, gut, brain. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 12(6), 1009–1011. <http://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.01.022>
- Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., & Conlon, M. A. (2012). Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(8), 2096–2102. <http://doi.org/10.1007/s10620-012-2167-7>
- Wang, X., Wang, B. R., Zhang, X. J., Xu, Z., Ding, Y. Q., & Ju, G. (2002). Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. *World Journal of Gastroenterology*, 8(3), 540–545. <http://doi.org/10.3748/wjg.v8.i3.540>
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Kellbaugh, S. A., ... Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105–108. <http://doi.org/10.1126/science.1208344>
- Yarandi, S. S., Peterson, D. A., Treisman, G. J., Moran, T. H., & Pasricha, P. J. (2016). Modulatory effects of gut microbiota on the central nervous system: how gut could play a role in neuropsychiatric health and diseases. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 22(2), 201–212. <http://doi.org/10.5056/jnm15146>
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <http://doi.org/10.1038/nature11053>

- Yehuda, S., Rabinovitz, S., & Mostofsky, D. I. (2005). Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging. *Neurobiology of Aging*, 26(SUPPL. 1), 98–102. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.013>
- Yu, H.-N., Zhu, J., Pan, W., Shen, S.-R., Shan, W.-G., & Das, U. N. (2014). Effects of fish oil with a high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota. *Archives of Medical Research*, 45(3), 195–202. <http://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.03.008>
- Zhang, R., Miller, R. G., Gascon, R., Champion, S., Katz, J., Lancero, M., ... McGrath, M. S. (2009). Circulating endotoxin and systemic immune activation in sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (sALS). *Journal of Neuroimmunology*, 206(1–2), 121–124. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.09.017>