

Universidade do Algarve

Probióticos: Aplicações, Riscos e Perspetivas Futuras

Rosa Rocha

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação da:
Professora Doutora Maria Leonor Faleiro

2022



Universidade do Algarve

Probióticos: Aplicações, Riscos e Perspetivas Futuras

Rosa Rocha

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação da:
Professora Doutora Maria Leonor Faleiro

2022

Declaração de Autoria

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright Rosa Rocha

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Chegar ao fim desta etapa é para mim motivo de grande satisfação, de sensação de objetivo alcançado. Não foi fácil conciliar a atividade profissional com a académica, muitos momentos de desânimo surgiram, mas foram ultrapassados com o incentivo e motivação dos que me acompanharam de perto.

Agradeço aos docentes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas por todo o conhecimento científico e por todos os valores transmitidos ao longo destes anos de curso. Em especial, agradeço à minha orientadora Professora Doutora Maria Leonor Faleiro, por ter aceite o convite para me orientar e instruir na realização desta tese.

Agradecer também aos colegas de curso que tornaram esta jornada mais leve, incentivando e nunca deixando desistir do objetivo final, sem eles teria sido bem mais difícil.

Não posso também deixar de agradecer às colegas de trabalho pela paciência, pelo incentivo e motivação, bem como à própria instituição, Santa Casa da Misericórdia de Portimão, pela possibilidade e facilidade que me deram de realizar este curso.

A toda a equipa da Farmácia Central, onde tive a oportunidade de estagiar, o meu agradecimento pela forma como fui acolhida, por todos os conhecimentos que me foram transmitidos e também pelo apoio e incentivo nesta fase final do curso.

Por fim, mas não menos importante, pois os últimos são sempre os primeiros, agradeço aos meus pais por estarem sempre ao meu lado, pela paciência e compreensão em todos os momentos e pela sua colaboração imprescindível na realização deste curso. Ao meu filho, que sempre foi o motivo da minha força e resiliência e ao meu namorado, por acreditar em mim e nunca me deixar desistir.

Resumo

A microbiota intestinal é constituída pelos microrganismos que colonizam o intestino humano, sendo o microbioma o conjunto dos genes que os compõem. A microbiota desenvolve-se desde o nascimento, atingindo a maturidade aos três anos de idade, desempenhando uma influência significativa sobre a saúde do hospedeiro ao longo de toda a sua vida. A sua ação benéfica no organismo humano gera uma condição de homeostase, que sofre influência de vários fatores como as condições ambientais, características genéticas e imunológicas do hospedeiro e administração de antibióticos. As conseqüentes disfunções causadas na microbiota, designadas por disbiose, provocam efeitos prejudiciais para a saúde do hospedeiro. Os probióticos, microrganismos viáveis que, quando administrados nas quantidades adequadas, provocam um efeito benéfico na saúde do hospedeiro, evidenciam ter capacidade para prevenir e até mesmo reverter a situação de disbiose. As bactérias que têm sido mais estudadas e utilizadas como probióticos pertencem aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, também sendo utilizada a levedura do género *Saccharomyces*. A eficácia dos probióticos foi estabelecida para a prevenção e tratamento de algumas patologias, contudo, a maioria dos resultados de investigação são ainda limitados ou inconsistentes para a recomendação do seu uso terapêutico na medicina. O estudo da microbiota intestinal está em constante desenvolvimento, surgindo novos potenciais organismos benéficos para a saúde do hospedeiro.

Palavras chave: Microbiota intestinal; Disbiose; Probióticos; *Lactobacillus*; *Bifidobacterium*

Abstract

The intestinal microbiota is the set of all microorganisms that colonize the human intestine, the microbiome being the set of genes that compose them. The microbiota develops from birth, reaching maturity at three years old, playing a significant influence on the host's health throughout its lifetime. Its beneficial action in the human body generates a condition of homeostasis, which is influenced by several factors such as environmental conditions, genetic and immunological characteristics of the host and administration of antibiotics. The resulting dysfunctions caused in the microbiota, called dysbiosis, have harmful effects on the health of the host. Probiotics, live microorganisms that, when administered in adequate amounts, have a beneficial effect on the health of the host, show their ability to prevent and even reverse the dysbiosis. The bacteria that have been most studied and used as probiotics belong to the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera, and the yeast of the genus *Saccharomyces* is also used. The effectiveness of probiotics has been established for the prevention and treatment of some pathologies, however, most research results are still limited or inconsistent for recommending their therapeutic use. The study of the intestinal microbiota is under constant development, with the emergence of new potential beneficial organisms for the health of the host.

Key words: Intestinal microbiota; Dysbiosis; Probiotics; *Lactobacillus*; *Bifidobacterium*

Índice

Agradecimentos	4
Resumo.....	5
Abstract	6
Índice de Figuras.....	8
Índice de Tabelas	9
Lista de Abreviaturas	10
1. Introdução.....	12
2. Metodologia.....	14
3. Microbiota Intestinal.....	14
3.1. Caracterização e desenvolvimento da microbiota intestinal.....	14
3.2. Relação com o hospedeiro	17
4. Disbiose.....	23
5. Probióticos.....	27
5.1. Definição e Aspetos Históricos	27
5.2. Características e Propriedades	30
5.3. Mecanismos de ação	34
6. Probióticos e Aplicações Clínicas	38
7. Segurança e Riscos	58
8. Perspetivas Futuras	62
9. Conclusão	65
10. Referências Bibliográficas.....	69

Índice de Figuras

Figura 4.1 – Fatores influenciadores da disbiose e principais efeitos	23
Figura 5.1 - Propriedades de um probiótico ideal	32
Figura 5.2 - Mecanismos de ação dos probióticos	35

Índice de Tabelas

Tabela 5.1 - Microrganismos usados como probióticos.....	33
Tabela 6.1 - Probióticos e aplicações clínicas	57

Lista de Abreviaturas

AGCC – Ácidos Gordos de Cadeia Curta

SCI – Síndrome do Cólon Irritável

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

Treg – Células T reguladoras

IL – Interleucina

CU – Colite Ulcerativa

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization

MUC – Mucina

NK – Células Natural Killer

BCR – Recetor de células B

TCR - Recetor de células T

Th – Células T auxiliares

DAA – Diarreia Associada a Antibióticos

ESPGHAN WG - European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Working Group

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

IFN- γ - Interferão Gama

Th1 - Células T auxiliares tipo 1

IACS - Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde

UCI - Unidades de Cuidados Intensivos

SII - Síndrome do Intestino Irritável

DA – Dermatite Atópica

SCORAD - Scoring Atopic Dermatitis

LP - *L. paracasei*

LF - *L. fermentum*

La1 - *Lactobacillus johnsonii* NCC 533

FDA - US Food and Drug Administration

GRAS - Generally Recognized as Safe

OMS - Organização Mundial de Saúde

BSH - Hidrolase de Sais Biliares

1. Introdução

O conjunto de microrganismos que habitam o corpo humano, os seus genomas e metabolitos, bem como o ambiente em que vivem, é denominado microbioma. Os microrganismos que fazem parte do microbioma podem ser isolados de todas as áreas em CONTACTO constante com o ambiente externo (a pele, o trato respiratório superior ou o trato urogenital). No entanto, os microrganismos são mais abundantes no trato gastrointestinal.(1)

Desde o início do século XXI, que o interesse pelo microbioma humano, principalmente pelo microbioma intestinal tem aumentado e tem-se dedicado maior atenção ao estudo da sua constituição e funcionalidades. A microbiota intestinal desempenha um papel importante na regulação de diversas funções fisiológicas do hospedeiro, incluindo o metabolismo, o desenvolvimento e homeostase da imunidade e do sistema nervoso.(2)

Com o auxílio de tecnologias de sequenciação de última geração, foi possível definir a composição da microbiota, fazendo estudos num grande número de indivíduos ao longo do tempo, em diversas áreas geográficas, em diferentes estadios de desenvolvimento e em variadas condições ambientais. Foi possível concluir que a microbiota atinge a estabilidade aos três anos de idade, que existe uma grande variabilidade interpessoal na sua constituição e que é afetada e modificada por muitos fatores, tais como a localização geográfica, a dieta do hospedeiro e a administração de medicamentos.(3)

A relação de simbiose que existe entre a microbiota intestinal e o hospedeiro é regulada por uma rede complexa de interações metabólicas, imunológicas e interferências neuroendócrinas.(2)

Outro papel importante da microbiota intestinal é a resistência à colonização, conferindo proteção contra os agentes patogénicos e prevenindo o crescimento excessivo dos constituintes da microbiota patogénica.(2)

Mudanças relacionadas com a composição da microbiota podem levar a uma interrupção da homeostase intestinal em termos de integridade e fisiologia geral. Este

processo é chamado de disbiose, significando mudança na microbiota que está associada a um estado patológico.(4)

Embora só recentemente se ouça falar com maior interesse da microbiota intestinal e de toda a sua influência no organismo humano, este é um tema que desperta interesse nos cientistas há mais de um século. De facto, é possível ir até ao início do século XX, onde o cientista Elie Metchnikoff, demonstrou o seu interesse no estudo dos efeitos prejudiciais da microbiota intestinal na saúde do hospedeiro, bem como na possibilidade de se poderem administrar bactérias que contrariassem estes efeitos e que fossem promotoras da saúde, os chamados, probióticos.(3)

A palavra “probiótico” é originalmente derivada do latim, da palavra “pro” (para) e da palavra grega “bios” (vida), significando “para a vida”. Os probióticos são definidos como microrganismos viáveis que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro.(5)

Os probióticos devem ser identificados pelo género, espécie e estirpe. A maioria dos probióticos utilizados pertencem a três principais géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*. Os probióticos comercializados estão disponíveis como espécies únicas ou como combinação de várias espécies.(6)

A lista de microrganismos probióticos que podem ter efeitos positivos para a saúde é bastante extensa. Os probióticos são usados para corrigir desequilíbrios provocados por doenças agudas e crónicas, como disfunções do trato gastrointestinal, doenças do sistema cardiovascular, distúrbios metabólicos após tratamentos com antibióticos, hormonas e radioterapia, entre outras possíveis aplicações.(7)

Os mecanismos de ação dos probióticos não estão bem esclarecidos, no entanto, podemos incluir a competição com os agentes patogénicos pela adesão ao epitélio intestinal; a produção de compostos antibacterianos; a competição por nutrientes e acidificação do meio, impedindo o crescimento dos microrganismos patogénicos e a modulação imunológica.(8)

Numa perspetiva de futuro e tendo em conta as limitações da utilização de probióticos, surgiram outras formas possíveis de modulação da microbiota para além de prebióticos, probióticos e simbióticos, são os chamados pós-bióticos e paraprobióticos. Embora os pós-bióticos não contenham microrganismos vivos, eles apresentam um efeito

benéfico na saúde do hospedeiro, através de mecanismos semelhantes aos dos probióticos, ao mesmo tempo que os riscos associados à sua ingestão são menores.(1)

2. Metodologia

Foi realizada pesquisa e revisão da literatura sobre a microbiota e probióticos, abrangendo o período de 2004 a 2021, incluindo artigos de diversas áreas como gastroenterologia, pediatria, imunologia, entre outras. Para isso, utilizaram-se as bases de dados on-line *PubMed* e *ScienceDirect*, pesquisando as seguintes palavras-chave em diversas combinações: “*probiotic*”, “*microbiota*”, “*dysbiosis*”, “*Lactobacillus*”, “*Bifidobacterium*”, “*immunity*”, “*inflammatory bowel diseases*”, “*colitis ulcerative*”, “*crohn’s disease*”, “*irritable bowel syndrome*”, “*diarrhea*”. Inicialmente foi feita uma pesquisa geral e posteriormente, selecionados os artigos científicos desde 2004, sendo no entanto dada preferência a artigos e estudos mais recentes, ou seja, dos últimos 10 anos. Numa primeira etapa procedeu-se à pesquisa de artigos relacionados com a microbiota intestinal e a sua interferência no organismo humano, numa segunda etapa a pesquisa foi mais direcionada para os aspectos históricos dos probióticos e sua evolução e por último, o foco foram as aplicações e novas perspetivas para os probióticos.

3. Microbiota Intestinal

3.1. Caracterização e desenvolvimento da microbiota intestinal

Há mais de três décadas que se tem conhecimento de que o corpo humano é constituído por uma diversidade de espécies microbianas, que colonizam praticamente toda a superfície do corpo exposta ao meio externo, desde a pele, à cavidade oral, ao trato respiratório, urogenital e gastrointestinal. Sendo este último aquele que tem uma maior prevalência de espécies microbianas, sendo no seu todo denominada por microbiota intestinal.(9)

Inicialmente, os microrganismos eram vistos como invasores do organismo humano e a grande preocupação era o seu potencial para causar infeções e outros problemas de saúde. Assim, o principal objetivo da maioria dos estudos era encontrar formas de combater os agentes causadores de infeções, por exemplo o desenvolvimento

de antibióticos. Nos últimos 15 anos, com o desenvolvimento da sequenciação massiva foi possível adquirir um conhecimento mais profundo sobre a composição da microbiota do corpo. (10,11)

A microbiota do trato gastrointestinal é composta por uma enorme diversidade de espécies, que inclui bactérias, arqueas, fungos filamentosos e leveduras. Estes agentes microbianos, utilizam os componentes alimentares não digeríveis e substratos derivados do hospedeiro, como o muco, enzimas e células epiteliais, convertendo-os em vários metabolitos.(12) Estas espécies presentes no trato gastrointestinal, estão sujeitas a condições muito dinâmicas, influenciadas de modo muito significativo pela dieta do hospedeiro, pelo fluxo rápido de nutrientes, pela ação do sistema imunológico, pela entrada temporária de vários microrganismos, e ainda pela ocorrência esporádica de infeções e muito fortemente pelo uso de antibióticos. A flexibilidade da microbiota em se adaptar e resistir a condições tão pronunciadas no trato gastrointestinal, está intrinsecamente associada ao seu potencial metabólico diversificado, o que no conjunto faz dela um ecossistema excepcionalmente estável.(11,12)

No estudo da diversidade da microbiota intestinal são usadas atualmente técnicas independentes de cultura baseando-se na análise das sequências do gene 16S rRNA e 18S rRNA que permitem a identificação das células procariontes e eucariontes, respetivamente. (9)

Iniciativas como o Projecto Microbioma Humano, desenvolvido pela organização National Institute of Health, usam a sequenciação massiva dos genomas para a criação de uma base de dados de referência da composição da microbiota humana saudável.(4)

Os genomas combinados da microbiota intestinal, designados por microbioma, contém um número de genes cerca de 150 vezes maior do que o genoma humano, complementando-o e contribuindo para a normal fisiologia e metabolismo do hospedeiro.(10)

O interesse na composição da microbiota intestinal tem sido crescente, uma vez que é neste órgão que se encontra maior quantidade de bactérias e a maior diversidade de microrganismos, a densidade bacteriana pode atingir cerca de $10^{11} - 10^{12}$ células/g no cólon distal.(13) Contudo, as amostras que são na maioria dos casos recolhidas são as fezes, mas nestas amostras não estão representados todos os membros microbianos que

se podem encontrar no trato gastrointestinal, nomeadamente a comunidade microbiana do intestino delgado é diferente daquela identificada no cólon.(13)

Estima-se que o intestino de um adulto saudável contenha mais de 1000 espécies de bactérias e que pelo menos 160 delas sejam comuns entre indivíduos, tendo em consideração a diversidade microbiana interindividual existente. Os quatro principais filos que colonizam o trato gastrointestinal humano são *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, sendo as espécies que dominam a microbiota intestinal, pertencentes aos géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus*, estando presentes em menor quantidade as espécies *Escherichia* e *Lactobacillus*. As espécies pertencentes ao género *Bacteroides*, representam cerca de 30% de todas as bactérias presentes na microbiota intestinal, sendo assim possível estabelecer a ligação entre estas e o bom funcionamento do organismo humano.(10,11,14)

Ao longo da vida do hospedeiro a microbiota intestinal vai sofrendo variações na sua composição. Durante o período de gestação do feto, o seu trato gastrointestinal é estéril, embora estudos recentes sugiram a exposição microbiana durante este tempo, dado ter sido detetada a presença de bactérias no líquido amniótico, na placenta, no cordão umbilical e no mecónio. No entanto, a quantidade observada foi muito baixa, sendo considerado um impacto insignificante na colonização do intestino do bebé.(10,15,16)

Após o nascimento, o trato gastrointestinal do recém-nascido é rapidamente colonizado por microrganismos provenientes da mãe, cuja composição é diretamente influenciada pelo tipo de parto, nomeadamente se o parto é eutócico o bebé passa pelo canal vaginal com a exposição direta a um conjunto complexo de microrganismos, enquanto no parto distócico a composição da microbiota intestinal dos bebés é diferente.(11,14,17)

Inicialmente o trato gastrointestinal do bebé é colonizado por bactérias dos géneros *Lactobacillus* sp., *Bacteroides* e *Prevotella*, provenientes da microbiota vaginal da mãe. Enquanto que os bebés que nascem por cesariana apresentam uma microbiota intestinal dominada por *Staphylococcus*, *Clostridium difficile* e *Escherichia coli*. O tipo de amamentação também influencia o desenvolvimento da microbiota intestinal, uma vez que o leite materno proporciona uma maior dominância de estreptococos, bifidobactérias e *E. coli*, enquanto que o leite sintético leva ao desenvolvimento de enterobactérias e

Bacteroides. A microbiota intestinal do bebé sofre alterações mais significativas após a introdução de alimentos sólidos, atingindo o estado estacionário entre os dois e os três anos. No entanto, a microbiota está em constante reconfiguração, devido às variações diárias existentes na dieta, no estilo de vida, idade, fisiologia do hospedeiro e a atividade do sistema imunitário.(10,15,16)

Em adultos com idade igual ou superior a 65 anos, a microbiota intestinal e a sua estabilidade são afetadas por diversos fatores. Nesta faixa etária, a variabilidade interindividual é muito maior do que em bebés ou adultos até aos 65 anos. Esta variabilidade pode ser atribuída às alterações causadas pela senescência, como por exemplo a mudança no estilo de vida e alimentação, a diminuição da mobilidade, a redução intestinal e da sua funcionalidade, infeções recorrentes e o consumo de medicamentos. Existe então nos idosos, uma diminuição dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* e um aumento de *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* em comparação com adultos até aos 65 anos. No entanto, a associação das alterações da microbiota do idoso e o envelhecimento não está totalmente esclarecida e é sugerido que a manutenção da homeostase da microbiota é fulcral para o envelhecimento saudável, podendo ser um dos fatores cruciais da longevidade humana.(15–17)

3.2. Relação com o hospedeiro

A microbiota intestinal tem um papel importante em diversos processos que ocorrem no organismo humano, onde se pode salientar a sua interferência em alguns processos metabólicos, nutricionais, fisiológicos e imunológicos. No que respeita à atividade metabólica, é importante referir a participação da microbiota no processo de obtenção de energia a partir de polissacarídeos não digeríveis, presentes por exemplo no amido resistente e nas fibras alimentares. Esta atividade metabólica também potencia a produção de nutrientes importantes para o organismo humano, como os ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), vitaminas (por exemplo a vitamina k, B12 e o ácido fólico) e aminoácidos, cuja produção não é possível pelo próprio organismo. A microbiota exerce também ação a nível da defesa contra agentes patogénicos, através de processos de resistência à colonização e produção de compostos antimicrobianos. Para além disto, a microbiota intestinal está envolvida no desenvolvimento, maturação e manutenção das funções de barreira intestinal e do sistema imunológico gastrointestinal.(9)

I. Microbiota Intestinal e o Metabolismo do Hospedeiro

A dieta pode ter um grande impacto sobre o ambiente intestinal, sendo a modificação da ingestão dos três principais macronutrientes (carboidratos, proteínas e lípidos) o maior fator influenciador. Existe evidência de que alterando a composição e quantidade, por exemplo, de carboidratos ingeridos, por um período de quatro semanas, acontecem alterações profundas e rápidas na microbiota intestinal. Para além disto, o hospedeiro não possui as enzimas digestivas necessárias à degradação dos polissacarídeos derivados de fontes vegetais, tendo de recorrer à microbiota para a degradação dos mesmos.(18)

Os carboidratos são a principal fonte de energia proveniente da dieta humana e na sua maioria são diretamente absorvidos ou digeridos pelas enzimas digestivas e posteriormente absorvidos sob a forma de açúcares simples, na parte superior do trato digestivo. No entanto, uma parte dos carboidratos ingeridos contém ligações químicas que não conseguem ser degradadas pelas enzimas digestivas, não sendo digeridos. Nestes carboidratos inclui-se a celulose, a hemicelulose, a inulina e o amido resistente, que irão chegar à parte distal do trato digestivo, ficando disponíveis para a fermentação microbiana. Este é considerado um processo benéfico para a saúde humana, uma vez que contribuí para a melhor utilização destes alimentos não digeridos, pois são gerados metabolitos que podem ser usados como fontes de energia. Os principais produtos do metabolismo dos carboidratos são: gases (hidrogénio e dióxido de carbono), etanol e ácidos (butírico, propiónico, acético, fórmico, láctico ou succínico). Depois de todo o processamento pela microbiota, os produtos finais da fermentação dos carboidratos são gases e AGCC (acetato, propionato e butirato).(12,18)

O butirato é um AGCC que é usado como principal fonte de energia pelas células epiteliais intestinais, sendo dotado de propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias.(12) Por sua vez, o propionato é transportado para o fígado, onde irá ter uma função na gluconeogénese, tem também propriedades anti- inflamatórias, exerce um papel importante na sensação de saciedade e melhora a sensibilidade das células à insulina. Por fim, o acetato entra na circulação sanguínea e irá ser usado na lipogénese.(12,18)

O butirato foi considerado durante décadas, como a fonte essencial de energia, permitindo a proliferação celular e contribuindo para a manutenção da função de barreira

intestinal. No entanto, recentemente, vários estudos demonstraram que os seus efeitos vão mais além, podendo influenciar fortemente o ambiente microbiano, comunicando com as células do hospedeiro.(19) Foi demonstrado que o butirato ativa a β -oxidação nas células do cólon, permitindo evitar a expansão de agentes patogénicos no lúmen intestinal. Alguns estudos sugerem que a baixa quantidade de oxigénio presente no lúmen intestinal, ou seja, um ambiente anaeróbio, é condição necessária para prevenir a disseminação de agentes patogénicos anaeróbios facultativos, tais como as bactérias dos géneros *Salmonella* ou *Escherichia*, concluindo que a β -oxidação potenciada pelo butirato contribui para a limitação do oxigénio nas células do lúmen intestinal, contribuindo para a manutenção do ambiente anaeróbio.(19)

Os carboidratos resistentes às enzimas digestivas, como as celulosas e hemicelulosas, acabam por ser degradados ao passarem pelo trato digestivo. Esta degradação é realizada preferencialmente por bactérias do género *Bacteroides* sp. ou por *Ruminococcus* sp.(12)

As inulinas são outro carboidrato resistente, sendo a sua adição à dieta promotora do crescimento de bactérias do género *Bifidobacterium* sp. e *Faecalibacterium prausnitzii*, benéficas para a saúde humana. Foi demonstrado que na Síndrome do Cólon Irritável (SCI) ocorre uma diminuição destas espécies bacterianas, sendo também a redução da bactéria *F. prausnitzii*, um marcador da Doença de Crohn (DC). Existe evidência de que a ingestão de inulinas pode aumentar a frequência de defecação e melhorar a SCI, bem como os sintomas da Doença Inflamatória Intestinal (DII). (12)

O consumo de amido resistente é também benéfico para a saúde humana, uma vez que este irá ser degradado por *Ruminococcus bromii*, produzindo acetato, que posteriormente é convertido em butirato pela ação de *Eubacterium rectale* (atualmente *Agathobacter rectalis*) e *Roseburia* sp.. Sendo a presença de amido resistente promotora do crescimento e atividade de *Roseburia* sp., é considerada uma boa opção para manter o perfil de microbiota saudável, em doentes com Diabetes mellitus tipo 2, uma vez que nestes ocorre uma diminuição desta bactéria.(12)

As proteínas são uma parte importante da composição da dieta humana, sendo grande parte digerida pelas enzimas do trato digestivo. As proteínas de origem animal são mais facilmente digeríveis que as de origem vegetal.(12) A supressão dos ácidos gástricos dificulta a assimilação das proteínas da dieta, o que leva a que maior quantidade de

proteína chegue ao cólon. Para além das proteínas provenientes da dieta, as células possuem também no suco pancreático, muco e secreção epitelial, uma boa quantidade de proteínas disponível para a fermentação microbiana.(12,18) A fermentação de aminoácidos como fonte de energia ocorre no cólon distal, onde as fontes de carboidratos são nulas e o pH luminal é praticamente neutro. A principal via de fermentação dos aminoácidos no cólon distal é a desaminação, dando origem a AGCC, amónia, aminas, compostos N-nitrosos, compostos fenólicos e sulfuretos. Cerca de 30% do substrato é convertido nos principais AGCC, acetato, propionato e butirato e também nos ácidos gordos ramificados isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato.(12,18)

A concentração de amónia fecal varia entre 12 a 30 mM e pode aumentar com o aumento da ingestão de proteínas. A amónia produzida é rapidamente absorvida, metabolizada em uréia pelo fígado e eliminada pela urina. A amónia provoca alterações na morfologia dos tecidos intestinais, podendo atuar como um promotor de tumores no intestino. A desaminação bacteriana de aminoácidos aromáticos origina compostos fenólicos p-cresol, fenilpropionato e fenilacetato, levada a cabo por bactérias dos géneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Enterobacter*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. A descarboxilação bacteriana de aminoácidos e péptidos leva à produção de uma grande variedade de aminas. O seu potencial tóxico pode estar associado ao facto de serem precursoras da formação de nitrosaminas, que são cancerígenas.(18) Outro metabolito resultante da fermentação bacteriana das proteínas são os sulfuretos, estes quando em elevadas concentrações no cólon, estão ligados a doenças inflamatórias intestinais e a colite ulcerativa.(12,18)

Relativamente ao metabolismo dos lípidos, não existe nenhuma evidência de que a microbiota intestinal esteja envolvida neste processo. Contudo, a ingestão de lípidos está ligada à produção de ácidos biliares que podem ser transformados em metabolitos bioativos pelas bactérias intestinais. Diariamente uma grande quantidade de ácidos biliares é secretada no intestino, sendo 80% da mesma absorvida no íleo terminal para o sangue e re-secretada pelo fígado no processo denominado de recirculação entero-hepática. Os ácidos biliares que não são absorvidos, sofrem um processo de desconjugação enzimática levado a cabo pelas bactérias do íleo terminal e cólon. A capacidade generalizada das bactérias presentes no intestino executarem este processo de desconjugação, evidencia que provavelmente este será um processo necessário à sua sobrevivência no intestino.(12)

II. Microbiota Intestinal e Imunidade

O trato gastrointestinal é considerado o maior órgão imunológico do corpo humano, desempenhando um papel fulcral na regulação da homeostase imunológica. A barreira formada pelo epitélio intestinal não é uma barreira física estática, havendo interação entre a microbiota intestinal e as células do sistema imunológico. A microbiota desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro, estabelecendo-se uma relação de simbiose entre os dois, que permite a modulação das respostas a agentes patogénicos, bem como a regulação da tolerância a antígenos inócuos. O trato gastrointestinal é a principal linha de defesa do hospedeiro, em que as células epiteliais formam uma barreira física e conjuntamente com as células imunológicas e estromais, lutam contra agentes patogénicos, limitando o seu CONTACTO direto com o epitélio. Uma característica única da microbiota intestinal é a sua capacidade de tolerância imunológica em relação às mudanças constantes de microrganismos inofensivos, agentes patogénicos ou intrusão de microrganismos comensais. O epitélio é constituído por uma única camada de diferentes células epiteliais intestinais, que participa fortemente na imunidade inata.(20–22)

A colonização da microbiota no início da vida é necessária para o desenvolvimento ideal do sistema imunológico. O trato gastrointestinal fetal é considerado estéril, sendo a primeira exposição do sistema imunológico aos microrganismos comensais durante a passagem pelo canal de parto, sendo considerada essencial para o sistema imunológico a longo prazo. Nos recém-nascidos e bebés, devido à imaturidade do sistema imunológico, existe maior suscetibilidade a vários agentes patogénicos, sendo as doenças inflamatórias a principal causa de morte em crianças.(22) O colostro e o leite materno possuem microrganismos viáveis, metabolitos, imunoglobulina A (IgA), células do sistema imunológico e também citocinas, havendo uma sinergia entre todos para ajustar a microbiota do bebé e a resposta à presença destes microrganismos. A diversidade na colonização da microbiota nos primeiros anos de vida é crucial para estabelecer uma rede imunorreguladora, que irá proteger da indução de imunoglobulina E (IgE) da mucosa, que está diretamente ligada à suscetibilidade alérgica. O desenvolvimento do sistema imunológico é caracterizado pela produção de citocinas inflamatórias e pelo desenvolvimento de células T e B, como respostas reguladoras. A microbiota desempenha um papel crucial no desenvolvimento da estrutura linfóide, sendo

este efeito visível no número reduzido de células T CD4⁺ e células plasmáticas produtoras de IgA.(21,22)

A exposição precoce do hospedeiro a microrganismos comensais pode reprimir a indução de respostas inflamatórias, o que tem consequências a longo prazo na capacidade do hospedeiro desenvolver doenças inflamatórias. É a capacidade altamente reguladora do sistema imunológico neonatal e a ação dos microrganismos comensais no desenvolvimento e treino desse sistema, que estabelecem uma relação hospedeiro/comensal durável e homeostática.(21) Embora seja provável que a tolerância imunológica seja alcançada recorrendo a múltiplos fatores, nos últimos anos, as células T reguladoras (Treg) Foxp3 ocuparam o papel central na compreensão deste processo. Estas células mantêm a homeostase periférica e da mucosa ao longo da vida do hospedeiro e a interrupção da mesma resulta na perda de tolerância oral e no desenvolvimento de respostas efectoras anormais no intestino.(21) Embora estas células Treg possam surgir como células diferenciadas no timo, o trato gastrointestinal é o local privilegiado para a indução da produção das mesmas em resposta a antigénios orais.(21) A capacidade da microbiota controlar a infeção também está associada à sua capacidade de promover e regular tanto a imunidade inata como a adaptativa. A microbiota tem o importante papel de direcionar as células a responder a uma infeção tanto sistémica como localmente. Um exemplo é a capacidade da microbiota controlar a produção de interleucina (IL) -1 β , uma citocina envolvida nos mecanismos de defesa do hospedeiro, contribuindo para a produção homeostática de pró-IL-1 β , pelos macrófagos residentes no intestino, preparando estas células para uma resposta rápida a infeções entéricas, por conversão da pró-IL-1 β em IL-1 β ativa.(21,22)

A pele, o trato gastrointestinal ou os pulmões são habitats naturais da microbiota e locais por onde os agentes patogénicos podem com facilidade colonizar e invadir o hospedeiro, sendo os principais locais de infeção. Assim, a interação inicial entre agentes patogénicos e o sistema imunológico ocorre num ambiente condicionado e regulado pela microbiota comensal. Os microrganismos comensais podem interagir direta e dinamicamente com os agentes patogénicos e células do sistema imunológico e os resultados dessa interação irão definir a patogénese e o resultado de uma determinada infeção. A microbiota da pele induz uma imunidade protetora e reguladora que contribui para o mutualismo entre os microrganismos e o hospedeiro. Uma das espécies comensais mais abundantes na pele é a bactéria *Staphylococcus epidermidis*, que pode induzir

respostas antimicrobianas da pele, bem como promover a reparação dos tecidos, em caso de lesão. Os metabólitos microbianos, como os AGCC, produzidos pela bactéria comensal *Propionibacterium acnes*, podem modular a atividade inflamatória dos queratinócitos.(21,22)

4. Disbiose

A microbiota interage numa série de tarefas críticas para o hospedeiro e, é claro que sem este suporte microbiológico, a anatomia e fisiologia humanas seriam bastante diferentes. Assim, é fácil perceber que se esta relação homeostática é perturbada, irão surgir consequências para o organismo humano. Mudanças relacionadas com a composição da microbiota podem levar a uma interrupção da homeostase intestinal em termos de integridade e fisiologia geral. Estas mudanças nas proporções entre os membros dos diferentes filos que constituem a microbiota intestinal, ou a introdução de novos grupos de bactérias, levam a um desequilíbrio promotor de doenças, que é denominado por disbiose.(4,23,24) A figura seguinte resume os principais fatores influenciadores da disbiose e efeitos gerais ao nível dos microrganismos presentes na microbiota, que serão desenvolvidos em seguida. (14,24)(Figura 4.1)

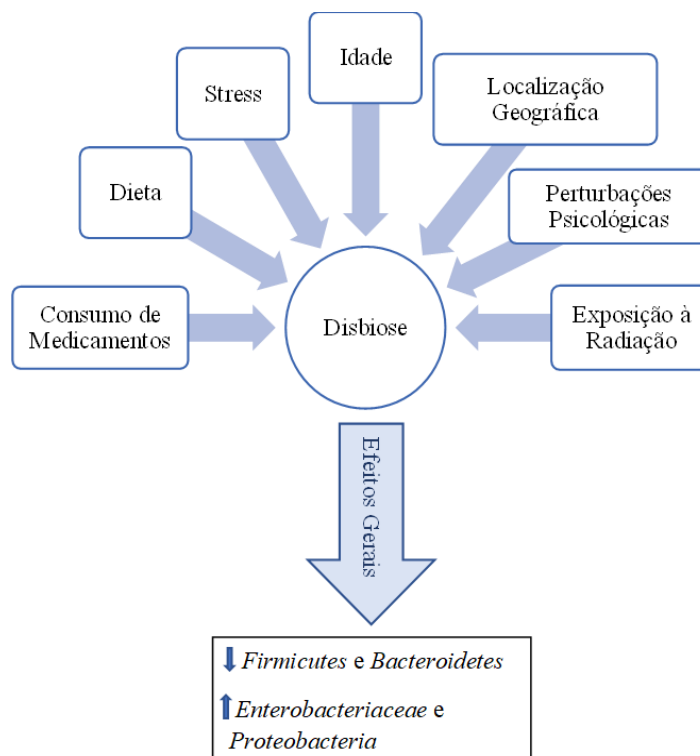


Figura 4.1 – Fatores influenciadores da disbiose e principais efeitos

O termo “disbiose” tornou-se comum para descrever situações relacionadas com alterações da composição ou da atividade da microbiota intestinal, para um estado que é considerado prejudicial à saúde do hospedeiro. São reconhecidos vários fatores que contribuem para o estabelecimento da disbiose, tais como a dieta, o stress, a idade, a localização geográfica, a exposição à radiação, perturbações psicológicas e o consumo de medicamentos, em especial antibióticos. Existe maior evidência do envolvimento da microbiota nas doenças do trato gastrointestinal, no entanto, também se relaciona com doenças mais amplamente disseminadas, como a diabetes, asma, obesidade, doença cardiovascular e atopia.(14,23)

Apesar da variação interindividual, existe uma série de características da microbiota que são mais comuns em estados de doença, como por exemplo, uma redução na diversidade bacteriana geral. Mais especificamente, independentemente da doença que está a ser estudada, são observadas reduções dos microrganismos anaeróbios obrigatórios do filo *Firmicutes* e em menor quantidade os membros do filo *Bacteroidetes*. Muitas vezes, esta redução acontece em simultâneo com o aumento de microrganismos anaeróbios facultativos, incluindo membros da família *Enterobacteriaceae*, do filo *Proteobacteria*, salientando uma série de agentes patogénicos oportunistas como a bactéria *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *E. coli*. Apesar das evidências existentes obtidas pela sequenciação do gene *16S rRNA*, que permitem observar a presença de determinados grupos bacterianos específicos em determinadas doenças, estes dados são considerados circunstanciais. Não é possível concluir se é o desenvolvimento elevado de determinadas bactérias na comunidade que poderá contribuir para o aparecimento da sua patogenicidade provocando doença ou se este desenvolvimento elevado acontece em simultâneo com outras alterações na microbiota intestinal, existindo assim a necessidade de identificar os fatores responsáveis pelas mesmas.(14,24)

A microbiota intestinal pode ser afetada por fatores exógenos e endógenos, dando origem a efeitos que podem ser inofensivos ou prejudiciais para o organismo humano. Tendo em conta o potencial metabólico diversificado da microbiota intestinal, por vezes, apenas um fator não é suficiente para gerar disbiose. Existe dificuldade em perceber se são as mudanças no hospedeiro que provocam a disbiose ou se pelo contrário é a disbiose que vai provocar a mudança do estado homeostático do hospedeiro.(4,24)

A dieta é o principal fator que afeta a microbiota intestinal, podendo as variações normais na ingestão de alimentos causar alterações transitórias na composição da mesma. A escassez de alimentos, levando à ausência de nutrientes no intestino, aumenta os níveis de Proteobacterias, que são promotoras de inflamação na parede da mucosa, o que poderá eventualmente causar uma quebra na barreira epitelial. Por outro lado, o excesso de alimentos, leva à obesidade, que está diretamente relacionada com a disbiose e com distúrbios metabólicos inflamatórios. A obesidade é caracterizada por uma diversidade microbiana reduzida e um maior número de bactérias do filo *Firmicutes*. A dieta normalmente é uma combinação de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, não sendo fácil determinar qual o efeito isolado de cada macronutriente na microbiota intestinal.(24)

No que diz respeito à administração de medicamentos, os grupos farmacoterapêuticos que mais influência têm na microbiota são os anti-inflamatórios não esteróides e os antibióticos.(24) Os primeiros, como por exemplo o ibuprofeno e o naproxeno, quando administrados por longos períodos de tempo, provocam um aumento das bactérias da família de *Bacteroidaceae* e *Enterobacteriaceae*.(24) Também os inibidores da bomba de prótons, que são associados à toma dos anti-inflamatórios não esteróides para minimizar o efeito destes ao nível do estômago, provocam alterações na microbiota, ocorrendo o aumento de *C. difficile*, associado a diarreia e a encefalopatia hepática em doentes com cirrose.(24) A estabilidade da microbiota é importante para manter o equilíbrio do sistema imunológico, sendo a administração de antibióticos uma ameaça a esta estabilidade. Estes vão provocar um enfraquecimento e até mesmo desaparecimento indiscriminado de bactérias presentes na microbiota, que persiste até longos períodos de tempo após a interrupção do tratamento com antibióticos. Vários estudos descrevem que a administração de antibióticos promove a disbiose.(4,25) Para além disto, o uso extensivo de antibióticos origina a colonização de bactérias que se tornam resistentes.(4,25) Por outro lado, a microbiota intestinal pode também exercer efeitos menos positivos no que diz respeito à metabolização de fármacos, uma vez que esta ação poderá diminuir a biodisponibilidade dos mesmos, afetando assim o efeito terapêutico.(24)

A microbiota tem grande influência no desenvolvimento de duas das formas mais prevalentes de DII, a doença de Crohn e a colite ulcerativa (CU), caracterizadas pela inflamação crónica que afeta a mucosa intestinal.(26)

Na DC, a disbiose provoca maiores alterações na população de *Faecalibacterium prausnitzii*, que está associada ao prolongamento da remissão da doença.(26) Por outro lado, as espécies *E.coli* e *Mycobacterium paratuberculosis* foram associadas à patogénese da doença.(26)

Para além da DII, dos distúrbios metabólicos como a obesidade e a diabetes tipo 2, a microbiota intestinal, como já foi mencionado, também está relacionada com outras doenças crónicas do trato gastrointestinal, tais como a SCI, doença celíaca e cancro do cólon. No entanto, ainda não foi observado um padrão claro de alterações na microbiota que se possa relacionar com estas doenças. No caso da doença celíaca, um estudo recente descreveu a relação entre a genética do hospedeiro e a composição da microbiota em relação ao desenvolvimento da doença. A expressão do antigéneo leucocitário DQ2 é considerado um forte fator de risco para o desenvolvimento da doença celíaca.(26)

Existem evidências de que há uma interação entre o intestino e o pulmão, com grande importância para a manutenção da homeostase imunológica. Os mecanismos por de trás desta interação não estão esclarecidos, mas há evidência de que as doenças a nível intestinal e respiratório apresentam alterações patológicas sobrepostas, indicando que uma inflamação intestinal pode levar à ocorrência de uma inflamação pulmonar.(27) Assim, é perceptível que indivíduos com doenças gastrointestinais crónicas têm maior prevalência de doenças pulmonares.(27)

A disbiose pode também afetar a pele, pois esta está em contacto com o ambiente externo e está em constante exposição a uma variedade de condições que afetam as comunidades bacterianas presentes nela. Existem diversos fatores como a humidade, a temperatura, o tipo de roupa, os cosméticos, os produtos de higiene e a idade, que vão desregular a microbiota da pele, podendo levar a que apareçam anormalidades.(23)

O acne, por exemplo, é uma complicação comum da pele, que surge principalmente na adolescência, derivada do aumento de folículos pilosos e da maturação das glândulas pilossebáceas.(23) Estas glândulas, produtoras de sebo, vão enriquecer os nutrientes presentes na pele e vão desencadear a proliferação de microrganismos como a bactéria *Propionibacterium acnes*, que pode metabolizar os lípidos do sebo. Estes microrganismos secretam lipases e proteínas para reduzir o sebo, no entanto, estas acabam por atacar os tecidos adjacentes às glândulas sebáceas, desencadeando uma resposta de defesa do organismo, com o aparecimento de indesejáveis manchas no rosto. (23)

O eczema é outra doença da pele que tem como origem o desequilíbrio da microbiota. É uma doença crónica e recorrente que é mais prevalente em crianças do que em adultos, sendo caracterizada pelo crescimento descontrolado de *Staphylococcus aureus* e consequente diminuição da diversidade microbiana, o que facilita a proliferação indesejada de *Streptococcus*.(23) Estes novos microrganismos presentes na pele, secretam toxinas que induzem a desgranulação dos mastócitos dérmicos e forçam o sistema imunológico a responder.(23)

No caso da psoríase, doença prevalente em todo o mundo, ocorre uma diminuição da biodiversidade da microbiota da pele, impulsionada pela proliferação exacerbada de *Staphylococcus*, provocando uma redução de outros membros do filo *Firmicutes*. Fatores ambientais como a temperatura, a humidade ou a utilização de determinados cosméticos pode acelerar o início e a gravidade da doença. Nas lesões da psoríase há o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos e de outros agentes moduladores que vão ativar o sistema imunológico do organismo.(23)

É difícil determinar o que define o perfil de uma microbiota saudável, pois existe um fator muito importante que influencia esta determinação, que é a variabilidade genética individual, tornando muito complexo o processo de determinar de que forma afetará o hospedeiro, a perda ou o ganho de bactérias específicas. Para além deste facto, uma vez que a composição da microbiota intestinal muda ao longo da vida, é crucial determinar a altura específica para intervir na composição da mesma, de modo a desenvolver terapias eficazes para prevenir doenças.(20)

5. Probióticos

5.1. Definição e Aspetos Históricos

O reconhecimento da relação entre a microbiota intestinal saudável e a doença reporta ao tempo de Hipócrates (460-370 AC), que declarou: “Todas as doenças começam no intestino”(6). No antigo testamento, também é sugerido que as bactérias poderiam ter um efeito benéfico sobre a saúde, tendo sido descrito que a longa vida de Abraão se deveu ao consumo de leite(6). Na história mais recente temos o trabalho de Theodor Escherich, que em 1886, descreveu a relação das bactérias intestinais com a fisiologia da digestão

no bebé (6) e em 1892, Ludwig Doderlein propôs que microrganismos (lactobacilos) poderiam ser usados para tratar infeções vaginais.(6)

No entanto, só no início do século XX, Eli Metchnikoff, vencedor do prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1908, considerado o pai do conceito “probiótico”, formulou a hipótese de que a ingestão de microrganismos viáveis tinha um efeito positivo na microbiota intestinal e assim, melhorar a saúde humana e a longevidade.(5,28)

Louis Pasteur desenvolveu grande parte das suas investigações na área da microbiologia da fermentação, enquanto que Eli Metchnikoff tentou descobrir o potencial efeito desses microrganismos na saúde humana. Pasteur associou a maior longevidade da população ao consumo de produtos lácteos fermentados (29) e, Metchnikoff, através dos seus estudos sugeriu que as bactérias, as quais denominou por “Bulgarian bacillus” podiam colonizar o intestino, diminuindo o número de bactérias patogénicas, retardando assim o processo de envelhecimento.(6,29)

Inúmeras tentativas foram feitas para modular a microbiota intestinal com o auxílio de microrganismos viáveis, sempre visando a melhoria da saúde do hospedeiro.(5)

Nesta mesma época, Henry Tissier, um pediatra francês, observou que em crianças que sofriam de diarreia, era possível identificar nas suas fezes, uma população reduzida de bactérias caracterizadas pela sua morfologia em forma de Y (bífido), em contraste, essas bactérias eram abundantes em crianças saudáveis. Assim, Tissier sugeriu a administração destas bactérias a doentes com diarreia, para restaurar a microbiota intestinal. Posteriormente, estas bactérias denominadas por “Bifidus” foram renomeadas por *Bacillus acidophilus*, devido à sua tolerância à acidez. Os trabalhos de Metchnikoff e Tissier foram os primeiros a apresentar evidências científicas em relação à utilização de bactérias probióticas, mesmo que a palavra “probiótico” não tenha sido mencionada antes de 1960.(6,30,31)

Em 1917, durante a Primeira Guerra Mundial, Alfred Nissle isolou uma estirpe não patogénica de *E. coli*, nas fezes de um dos poucos soldados que não sofreu de enterocolite durante um surto de Shigelose. A bactéria *E. coli* Nissle 1917, foi subsequentemente usada para tratar as infeções Salmonelose e Shigelose.(6)

Minoru Shirota, em 1930, reconheceu o potencial terapêutico do uso de bactérias moduladoras da microbiota intestinal, ele conseguiu isolar e cultivar estirpes de

Lactobacillus capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, denominando as estirpes de *Lactobacillus casei*. (6,32)

Em 1965, Lilly e Stillwell, utilizaram pela primeira vez o termo “probiótico” para designar substâncias produzidas por microrganismos que estimulam o crescimento de outros microrganismos. A palavra “probiótico” é originalmente derivada do latim, da palavra “pro” (para) e da palavra grega “bios” (vida), significando “para a vida”.(5,28,30)

Roy Fuller, em 1989, mudou um pouco o foco da definição de “probiótico”, mais direcionado para a caracterização das estirpes de microrganismos usadas, definindo-o como sendo um suplemento alimentar microbiano viável, que afeta benéficamente o hospedeiro, contribuindo para melhorar o seu equilíbrio microbiano.(5,6,28,30)

A definição mais recente, mas provavelmente não a última, elaborada pela organização “Food and Agriculture Organization of the United Nations” / “World Health Organization” (FAO/WHO), em 2001, define os probióticos como microrganismos viáveis que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro. Desde então, esta é a definição mais amplamente aceite e usada em todo o mundo.(5,28,33)

Esta definição restringiu o uso do termo “probiótico” apenas a produtos que contenham microrganismos viáveis e apontou para a necessidade do estabelecimento de uma dose adequada de probióticos para a obtenção do efeito desejado, tendo a FAO/WHO reconhecido que as propriedades e os benefícios potenciais dos probióticos, dependem da dose e não podem ser extrapolados entre diferentes estirpes, mesmo que pertençam à mesma espécie.(28,30)

A exploração comercial desta área surgiu muito rapidamente, apesar de nem sempre os resultados terem sido positivos, o que levou a que o conceito de probiótico fosse dado como cientificamente não comprovado e durante décadas tivesse sido alvo de pouco interesse. No entanto, no final dos anos 80, o interesse aumentou e proporcionou avanços significativos na seleção e caracterização de culturas específicas de probióticos e na comprovação dos seus efeitos na saúde.(30)

5.2. Características e Propriedades

A alteração dos fatores ambientais, o stress, os distúrbios alimentares entre outros, levaram ao desenvolvimento e implementação prática do conceito de probiótico, sendo o principal objetivo da sua utilização aumentar o número e a atividade dos microrganismos intestinais com propriedades úteis ao hospedeiro.(7,34)

O probiótico ideal deve permanecer viável ao nível do intestino e deve aderir ao epitélio para gerar o seu efeito e assim conferir um benefício significativo à saúde do hospedeiro. A avaliação destas propriedades dos probióticos é feita seguindo as diretrizes da FAO/WHO, que indicam que os microrganismos probióticos para além de terem de ser resistentes à passagem pelo trato gastrointestinal, também têm de ter a capacidade de proliferar no intestino.(30) É possível então constatar, que o efeito benéfico dos probióticos é conseguido através da sua possibilidade de crescimento e/ou de atividade na microbiota intestinal. Assim, a seleção da estirpe potencialmente probiótica deve ser fundamentada na especificidade de ação, pois é a sua capacidade de se manter viável no intestino e de ser eficaz, que vai definir o seu potencial probiótico. (30,35)

A escolha da estirpe potencial probiótica acaba também por depender das suas propriedades tecnológicas, por exemplo, a sua possibilidade de produção em larga escala e a sua capacidade de resistir a condições de armazenamento por períodos definidos, em condições menos rigorosas, de modo a garantir a sua viabilidade durante o período determinado como sendo o seu tempo de vida útil.(36)

As tecnologias de biologia molecular e microbiologia mais recentes têm facilitado o processo de identificação e caracterização das estirpes bacterianas, evitando qualquer dúvida na identidade das mesmas (37). A identificação das estirpes individuais é essencial quando são utilizados microrganismos na formulação de produtos probióticos. A análise filogenética, utilizando métodos como a sequenciação do gene *16S rRNA* e comparando os resultados com o Ribosomal Database Project, permite obter informações detalhadas e confirmar a identidade das estirpes bacterianas.(30,37)

As bactérias probióticas são identificadas pelo género, espécie, sub-espécie (se aplicável) e uma designação alfanumérica específica para cada estirpe, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura (37). A sequência do genoma de cada estirpe tem que estar disponível, de modo a permitir a identificação de cada gene envolvido no metabolismo bacteriano e a sua função.(37,38)

Devido ao grande número de estirpes isoladas, existe a necessidade de realizar uma série de testes de seleção dos potenciais probióticos, sendo selecionadas as estirpes que apresentarem o maior número de propriedades funcionais e, simultaneamente, sem nenhum ponto negativo.(39)

O primeiro fator a ser avaliado é a capacidade de determinada estirpe ultrapassar as condições de stress que a bactéria vai encontrar no processo de colonização do trato gastrointestinal humano. Estas condições começam desde o momento da administração, com a presença de enzimas, como a amilase e a lisozima, na cavidade oral. De seguida, são sujeitas ao baixo valor de pH e ao suco gástrico no estômago e por último, têm de superar a presença de pancreatina e sais biliares no intestino. Geralmente, a viabilidade dos microrganismos nestas condições é específica da espécie e da estirpe, sendo a resistência ao valor de pH baixo e a capacidade de hidrolisar os sais biliares, características fundamentais para a sua seleção como estirpe probiótica.(37,39)

De seguida, é avaliada a capacidade de adesão dos microrganismos às células epiteliais intestinais e por consequência a sua capacidade de colonização. A adesão dos microrganismos às células epiteliais está relacionada com a sua capacidade de autoagregação e com as propriedades hidrofóbicas da superfície celular. A autoagregação irá potenciar uma maior densidade celular no intestino, contribuindo para o mecanismo de adesão, quanto à hidrofobicidade irá permitir uma maior interação entre o microrganismo e as células epiteliais intestinais.(39)

Por último, será avaliada a atividade anti-patogénica dos microrganismos, que uma vez que tenham aderido ao epitélio intestinal, terão de ser capazes de produzir componentes antibacterianos extracelulares (como as bacteriocinas), através da conversão de carboidratos, proteínas e outros compostos, em substâncias com o poder de eliminar bactérias patogénicas.(39) A figura 2 apresenta em resumo as propriedades de um probiótico ideal.(30,35–37,39)

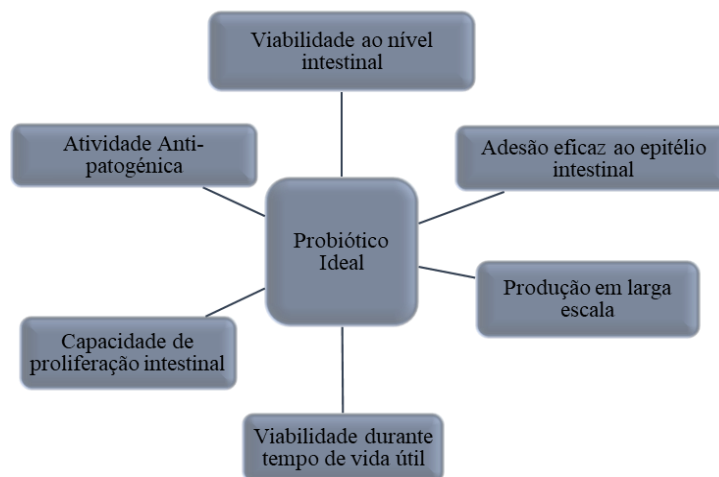


Figura 5.1 - Propriedades de um probiótico ideal

Após inúmeras pesquisas *in vitro*, ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos em grande escala, apenas os microrganismos bem documentados podem ser introduzidos no mercado como probióticos. A maioria dos microrganismos probióticos são bactérias ácido lácticas, Gram-positivas, incluindo espécies dos géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* e *Streptococcus*; espécies não ácido lácticas, tais como, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium freudenreichii*; e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*. Pode existir alguma controversia na aplicação das últimas como probióticos, uma vez que são formadoras de esporos, mas de facto elas apresentam propriedades benéficas na sua utilização, como por exemplo, o facto de serem termoestáveis, resistentes a condições de baixo valor de pH e permitirem o armazenamento por longos períodos, sem necessidade de refrigeração.(34,36)

As espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram consideradas as que têm maior capacidade de promover benefícios na saúde do hospedeiro, quando constituem a formulação de produtos lácteos. As bactérias do género *Bifidobacterium* fazem parte da microbiota intestinal, mas também podem ser encontradas na cavidade oral e nas secreções vaginais. As formulações probióticas que contêm este género, são compostas por uma única espécie combinada com outros microrganismos probióticos. As espécies mais comuns de *Bifidobacterium* usadas nas formulações probióticas são: *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. lactis* e *B. longum* subsp. *Longum*. Estas espécies de *Bifidobacterium* são conhecidas por estimularem o sistema imunológico, produzirem vitamina B, inibirem o desenvolvimento

de microrganismos patogénicos e por ajudarem a restabelecer a microbiota após o tratamento com antibióticos.(6,40,41)

As bactérias do género *Lactobacillus* normalmente fazem parte da microbiota de um intestino saudável, no entanto, estão presentes em concentrações relativamente baixas, mesmo em indivíduos que consomem probióticos. Podem também ser encontrados nas secreções vaginais de mulheres saudáveis. Algumas espécies de *Lactobacillus* presentes em iogurtes e em suplementos probióticos incluem *L. acidophilus*, *L. acidophilus* DDS-1, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. johnsonii* e *L. gasseri*.(6)

São vários os benefícios que o consumo de probióticos pode oferecer à saúde do hospedeiro, indo desde a modulação da microbiota intestinal, à reestruturação da microbiota após o tratamento com antibióticos, à promoção da resistência gastrointestinal e urogenital à colonização por microrganismos patogénicos, à estimulação do sistema imunológico, ao alívio da obstipação, ao tratamento de alguns tipos de diarreia, até à produção de vitaminas que são absorvidas pelo hospedeiro.(34)

A tabela seguinte apresenta em resumo os microrganismos utilizados como probióticos em suplementos.(adaptado de 6,34,36,40,41) (Tabela 1)

Tabela 5.1 - Microrganismos usados como probióticos

<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	Outras Bactérias Ácido Láctico	Bactérias Não Ácido Láctico	Leveduras
<i>B. animalis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>B. adolescentis</i>	<i>L. acidophilus</i> DDS-1	<i>Lactococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>B. breve</i>	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>Pediococcus</i>		
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>Sporolactobacillus</i>		
<i>B. lactis</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>Streptococcus</i>		
<i>B. longum</i> subsp. <i>Longum</i>	<i>L. salivarius</i>			
	<i>L. casei</i>			
	<i>L. johnsonii</i>			
	<i>L. gasseri</i>			

5.3. Mecanismos de ação

Dentro da grande variedade de espécies probióticas, existem grandes diferenças entre estirpes da mesma espécie, uma vez que podem ter fenótipos e propriedades distintas, que podem conduzir a efeitos clínicos distintos. As várias pesquisas realizadas neste campo, afirmam que os mecanismos de ação dos probióticos são diversos e específicos para cada estirpe.(36)

Os efeitos gerais de melhoria da saúde do hospedeiro, incluem a manutenção da homeostase intestinal e da sua integridade, a exclusão competitiva na colonização por outros agentes que sejam patogénicos, a produção de AGCC e vitaminas, o metabolismo de sais biliares, a regulação do trânsito intestinal, o fornecimento de enzimas de digestão para a degradação de fibras não digeríveis e também a neutralização de agentes carcinogénicos ou xenobióticos.(42)

Os probióticos podem inibir o crescimento de agentes patogénicos, aumentar a resistência do intestino à invasão dos mesmos, melhorar a função da barreira epitelial, aumentar a tolerância à lactose, melhorar o sistema imunológico, entre outros efeitos benéficos. O mecanismo exato pelo qual os probióticos exercem os seus efeitos benéficos não é totalmente conhecido.(8,38)

A manutenção da imunidade intestinal ideal é essencial, não devendo existir inflamação excessiva nem imunidade comprometida no ambiente intestinal. Este equilíbrio é conseguido mantendo o número relativo de bactérias constituintes da microbiota intestinal, sendo um dos principais efeitos da administração de probióticos a manutenção da homeostase do número de bactérias entre os diferentes filos.(42)

Podem considerar-se assim três mecanismos gerais, através dos quais os probióticos exercem os seus efeitos benéficos.(43–46) (Figura 1)

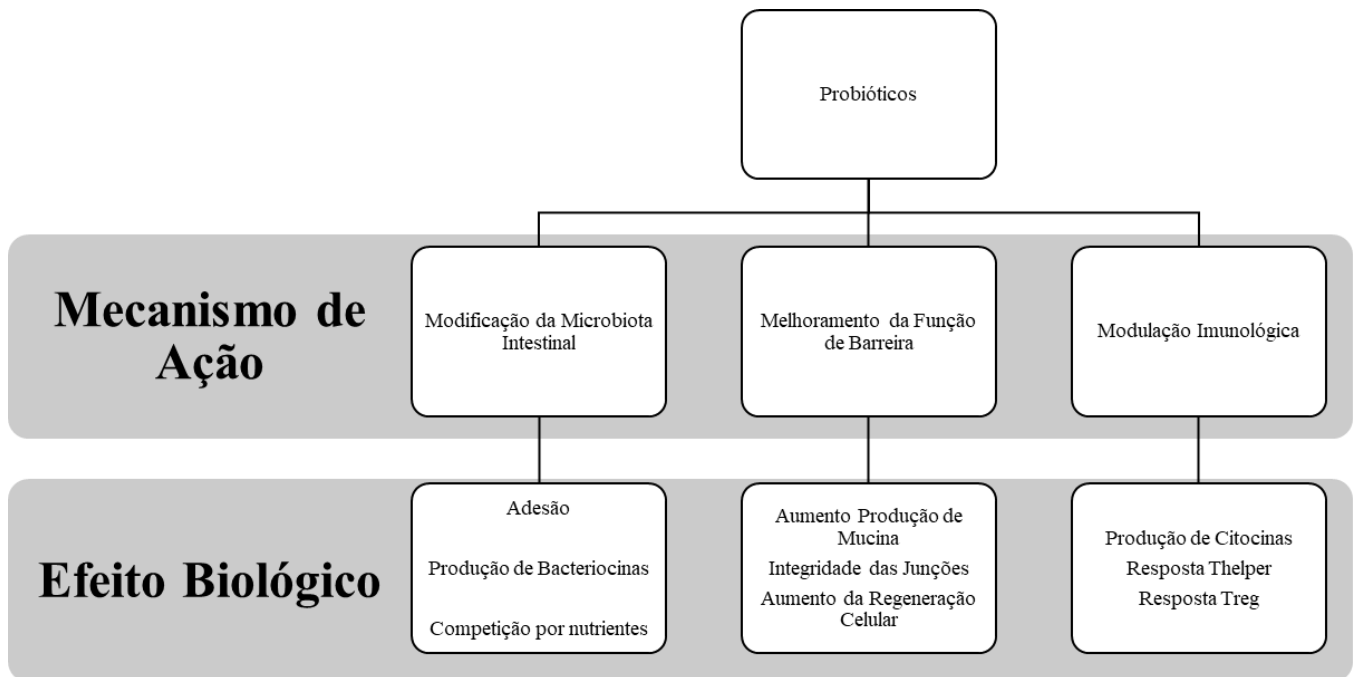


Figura 5.2 - Mecanismos de ação dos probióticos

- **Mecanismo de modificação da microbiota intestinal**

Os probióticos exercem um efeito antibacteriano ao libertar, no ambiente intestinal, moléculas antibacterianas e por ocupação do espaço, ou seja, impedem o crescimento de outros microrganismos potencialmente patogénicos. As estirpes probióticas diminuem a adesão e invasão celular, pela produção de produtos como as bacteriocinas, o peróxido de hidrogénio e ácidos orgânicos e também pela sua capacidade de reduzir o pH luminal, criando um ambiente fisiologicamente restritivo.(43) Por exemplo, *Lactobacillus reuteri* pode produzir reuterina, um metabolito secundário com atividade antimicrobiana de amplo espectro, que pode modular a composição da microbiota, bem como inibir diretamente patogénios entéricos.(45)

Os probióticos podem produzir bacteriocinas de amplo ou estreito espectro, que inibem o crescimento de outras bactérias, e podem afetar diretamente os patogénios entéricos. Como exemplo bem desenvolvido temos a bacteriocina classe II Abp118 que é produzida por *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 e inibe a infeção por *L. monocytogenes* e a rutura da barreira intestinal.(45)

- **Mecanismo de melhoramento da função de barreira**

Os probióticos ao aderirem ao epitélio intestinal, competem com os microrganismos patogénicos, evitando a invasão do epitélio pelos mesmos. De facto, os probióticos podem bloquear a adesão de agentes patogénicos competindo pelo mesmo recetor intestinal ou induzindo um aumento da produção de mucina, que inibe a adesão de vários microrganismos prejudiciais.(45,46)

Os probióticos podem influenciar as interações célula-célula do epitélio e a estabilidade celular através do melhoramento da função da barreira intestinal. A função de barreira intestinal é mantida pela secreção de muco, secreção de cloretos e água e pela ligação das células epiteliais nas suas junções apicais. A rutura desta barreira provoca uma série de condições como diarreia, doença inflamatória intestinal, doenças autoimunes, entre outras. O melhoramento desta função de barreira constitui assim um mecanismo importante entre os benefícios que os probióticos podem oferecer ao hospedeiro, tendo sido observado em modelos *in vitro* e *in vivo*. Os mecanismos pelos quais esta função é melhorada, não estão bem definidos, podendo estar relacionados com alterações na secreção de muco ou de cloretos ou com alterações na expressão das proteínas de junção pelas células epiteliais.(43,44)

No caso de *L. plantarum* subsp. *plantarum* 299v, foi evidenciada a sua capacidade de aumentar a produção e secreção de mucinas (MUC2 e MUC3) de células epiteliais intestinais humanas.(45)

Foi também demonstrado num estudo *in vivo*, utilizando um modelo de ratos, que a colonização dos mesmos com LGG, na 3ª semana pós-natal, provoca um aumento da secreção de MUC2.(47)

A barreira intestinal é essencial para prevenir a adesão de microrganismos patogénicos e regular a difusão paracelular para os tecidos do hospedeiro, sendo também essencial na diferenciação entre microrganismos comensais e patogénicos. Assim, os probióticos são essenciais na implementação da atividade da microbiota intestinal na manutenção da integridade da barreira intestinal, influenciando a secreção de muco e cloretos, evitando o rearranjo das proteínas de junção das células epiteliais após a exposição a agentes patogénicos e restaurando a barreira epitelial interrompida, aumentando a regeneração celular.(37,43,44)

- **Mecanismo de modulação imunológica**

A imunidade inata consiste no sistema de defesa de primeira linha contra agentes patogénicos, sendo constituído pelos neutrófilos, monócitos, macrófagos e células Natural Killer (NK), que permitem a sua ação na proteção contra a infeção.(48) A imunidade adaptativa consiste num processo de defesa mais lento, onde os linfócitos B e T exercem respostas imunes mais efetivas, possuindo recetores de antígenos específicos, o recetor de células B (BCR) e o recetor de células T (TCR). (49) As células T dividem-se ainda em células T CD8 e CD4, após o seu reconhecimento, as primeiras tornam-se células T citotóxicas e as segundas, células T auxiliares(Th) ou T reguladoras, sendo este sub-grupo responsável pela amplificação da resposta imune.(49)

Um mecanismo proposto para os probióticos é a modulação da resposta imunitária do hospedeiro envolvendo uma mudança no equilíbrio das respostas da mucosa para a produção de citocinas anti-inflamatórias.(50) Um estudo demonstrou que várias estirpes de *Bifidobacterium* promovem a produção da citocina anti-inflamatória, IL-10 pelas células T CD4+ isoladas do epitélio do cólon de rato, após administração oral do probiótico.(50) Num outro estudo, especificamente com o probiótico *Bifidobacterium breve* foi evidenciado que o mesmo tem a capacidade de promover o desenvolvimento de IL-10 pelas células Treg 1, sem alterar a composição da microbiota comensal intestinal.(51)

Os probióticos têm uma influência significativa na barreira intestinal, estimulando as células B para a produção de IgA. Estudos *in vitro* com células de enterócitos evidenciam que os probióticos influenciam a produção de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos, que iniciam respostas adaptativas.(48)

De acordo com a sua ação podemos dividir os probióticos em imunoestimuladores e imunoreguladores, os primeiros têm a capacidade de agir contra infeções, induzindo a produção de IL-12, que ativa as células NK e desenvolve as células Th1, estes probióticos também atuam no equilíbrio entre Th1 e Th2. Os probióticos imunoreguladores são caracterizados pela produção de IL-10 e células Treg, o que se revela na redução da alergia, doença inflamatória intestinal, doenças autoimunes e respostas inflamatórias.(48)

6. Probióticos e Aplicações Clínicas

Os primeiros ensaios clínicos para estudar os probióticos e a sua relação com determinadas doenças, ocorreram na década de 1930 e dedicaram-se maioritariamente à sua eficácia na obstipação.(52) Desde esta data que os estudos nesta área cresceram constantemente. Estudos extensos e bem documentados têm verificado efeitos dos probióticos na redução das doenças inflamatórias intestinais crónicas, na prevenção e tratamento de diarreia induzida por patogéneos, nas infeções urogenitais, na dermatite atópica, na síndrome do intestino irritável, na doença inflamatória do intestino e em infeções do trato respiratório superior. Estas pesquisas tentam também explicar a potencial influência dos probióticos na diarreia associada a antibióticos (DAA), na diarreia do viajante, nas alergias, na intolerância à lactose, na tensão arterial elevada e colesterol elevado e até no cancro.(52)

De seguida são apresentadas algumas, das muitas possibilidades, da aplicação das terapias probióticas.

- **Diarreia infecciosa aguda na criança**

A diarreia aguda é geralmente de origem viral, sendo caracterizada por uma frequência maior do número de evacuações, com duração de 10 a 14 dias e atingindo, maioritariamente, crianças entre os 6 meses e os 2 anos de idade.(8,46) Estas diarreias são causadas, por exemplo por rotavírus; infeções bacterianas, por exemplo por *Salmonella* spp., *Clostridium difficile* ou algumas estirpes patogénicas de *E. coli*; infeções parasitárias, por exemplo por *Giardia lamblia* ou *Cryptosporidium parvum*.(8) As infeções recorrentes conduzem a formas crónicas e agudas, que em último caso podem resultar em infeções mais graves.(8)

Os problemas gastrointestinais são mais comuns na população pediátrica, existindo uma série de estudos que abordam a eficácia dos probióticos no tratamento e prevenção da diarreia.(53)

De acordo com as diretrizes da “European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases” no tratamento da diarreia aguda em crianças, podem ser administrados os probióticos com eficácia comprovada, *L. casei* e *L. rhamnosus* (*Lactobacillus* GG) e *S. boulardii*.(8)

A diarreia infecciosa na criança é maioritariamente de origem viral, causada por rotavírus. A aplicação da terapia probiótica na diarreia infecciosa tem por base a redução no tempo de eliminação de rotavírus, a normalização da permeabilidade intestinal após a infeção por rotavírus e também pelo aumento da expressão de células secretoras de mucina e de IgA, que reagem contra o rotavírus.(54)

A diarreia associada a vômitos, desequilíbrio eletrolítico e desidratação, quadro clínico denominado por gastroenterite é também alvo de terapia com os probióticos mencionados acima, tendo esta aplicação um efeito essencialmente na redução da intensidade e duração dos sintomas.(53)

- **Diarreia associada a antibióticos**

A diarreia associada a antibióticos é definida como a diarreia que ocorre em relação ao tratamento com antibióticos, com exclusão de outras etiologias.(8)

Os antibióticos representam um quarto de todas as prescrições para crianças, potenciando uma forte possibilidade de desenvolvimento de efeitos adversos, sendo a DAA um deles.(55)

Estes efeitos colaterais do tratamento com antibióticos atingem entre 11 a 40% da população infantil e 5 a 39% dos adultos(8). Estes medicamentos causam alterações na composição da microbiota intestinal, levando à proliferação de estirpes bacterianas resistentes como *C. difficile*. Atualmente a indicação que existe é que cerca de 20% de todos os casos de DAA, estão relacionados com *C. difficile*. As alterações provocadas na microbiota, podem ser prevenidas através da redução do uso de antibióticos, da adequação do antibiótico a cada doença e da administração de probióticos.(56)

A alteração da microbiota intestinal mediada pelos antibióticos, pode provocar uma redução dos níveis de AGCC, como o butirato, o propionato e o acetato, que são os produtos finais primários do metabolismo dos carboidratos. A redução da biossíntese destes AGCC pode levar a DAA, porque estes compostos promovem a absorção de cloretos e água.(56)

Outra alteração que os antibióticos podem causar na microbiota, esta relacionada com o mecanismo de absorção ou secreção de soluto pelo epitélio intestinal, sendo que a

sua ausência resulta em diarreia aquosa. Neste campo, alterações mediadas por probióticos nos transportadores de eletrólitos intestinais podem ser um mecanismo de prevenção da DAA.(56)

A administração de antibióticos pode também interferir no processo de reabsorção dos ácidos biliares no íleo distal, o que resulta no aumento destes no cólon, o que vai inibir a atividade das proteínas de transporte epiteliais.(56)

Como já foi referido anteriormente, a integridade da barreira epitelial intestinal é importante para a patologia de várias doenças intestinais e sistémicas.(56) Os antibióticos vão induzir alterações no equilíbrio microbiano desta barreira, sendo a administração de probióticos uma hipótese capaz de restaurar a microbiota intestinal e restabelecer a função da barreira epitelial intestinal, prevenindo o desenvolvimento de DAA.(56,57)

Uma das aplicações mais comuns dos probióticos é na prevenção da DAA. Várias estirpes foram testadas e as que apresentaram maiores evidências de eficácia foram *L. rhamnosus* spp. GG e *S. boulardii* CNCM I-745.(8,55–57) Numa recente revisão sistemática por Cochrane et al.(57) foi demonstrado que a incidência de DAA é de 8% no grupo ao qual foram administrados os probióticos acima mencionados, comparado a 19% de incidência no grupo de controlo. (57) As diretrizes da “European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Working Group” (ESPGHAN WG) sugerem que a dose de probióticos consumida para que se obtenha o efeito desejado é de 10 a 20 biliões de unidades formadoras de colónias (UFC)/ dia de *L. rhamnosus* spp. GG ou 250 a 500 mg (5 a 10 biliões de UFCs por dia) de *S. boulardii*.(55,57) No entanto, esta revisão foi considerada moderada devido a questões de risco de viés e a inconsistência entre as estirpes probióticas usadas.(57)

Está em constante discussão a prescrição de probióticos sempre que um antibiótico é prescrito e tal procedimento deveria ser rotina, uma vez que o seu efeito benéfico na restauração da microbiota está comprovado e o facto da DAA resultar em doença grave.(58)

- **Diarreia do viajante**

Este tipo de diarreia afeta 20 a 40% dos indivíduos que viajam pela América Central e América do Sul, Sul da Ásia e África e, em menor percentagem, 10 a 15% naqueles que visitam o Médio Oriente, China, Rússia e Sul da Europa.(8,59) Em mais de 80% dos casos, a causa desta diarreia é uma infeção bacteriana, maioritariamente causada por *E. coli*. Neste caso, os antibióticos não são recomendados na prevenção e tratamento, sendo os probióticos uma possível alternativa.(8,60)

No entanto, a utilização de probióticos na prevenção da diarreia do viajante é alvo de bastante controvérsia, derivado ao desafio que se torna escolher a estirpe probiótica adequada, a garantia do controlo de qualidade dos produtos, a definição de uma dose ideal e da duração da terapêutica, bem como os requisitos específicos de armazenamento de alguns produtos.(61)

Apesar de não ter ficado totalmente esclarecida a eficácia dos probióticos na diarreia do viajante, e observando-se resultados não concordantes entre os vários estudos realizados (61), existe evidência da redução dos sintomas de diarreia com o consumo do probiótico *S.boulevardii*, relativamente ao grupo placebo, numa concentração de 5×10^9 a 1×10^{10} UFC, apresentado num estudo dirigido por McFarland. (8)

Contudo, existe a necessidade de realizar mais estudos e recolher mais dados, para que seja possível a definição de uma recomendação para a utilização de probióticos na prevenção e tratamento da diarreia do viajante. (61)

- **Infeções do trato respiratório**

No trato respiratório saudável estão presentes diversas comunidades microbianas, como bactérias, vírus e fungos, que vão sendo alteradas de acordo com a idade e a saúde do hospedeiro. Estas espécies presentes, conferem um mecanismo de defesa do hospedeiro contra a colonização por microrganismos patogénicos, sendo que um desequilíbrio ou perturbação permitirá o crescimento excessivo de bactérias e o consequente desenvolvimento de infeções do trato respiratório.(62)

As infeções do trato respiratório podem afetar a superfície da mucosa nasal, os seios da face, a faringe e/ou laringe. O tratamento passa pela administração de antibióticos

ou antivirais, no entanto, devido ao aumento da resistência bacteriana, existe uma procura por terapias alternativas, como a utilização de probióticos.(62)

Um dos benefícios do consumo de probióticos é a estimulação do sistema imunológico na saúde do hospedeiro, desempenhando um papel importante no equilíbrio do mecanismo de defesa. Neste sentido, foi realizado um ensaio clínico, com 136 adultos entre os 25 e 45 anos, com a administração de uma bebida probiótica (*L.paracasei*, *L. casei* 431® e *L. fermentium* PCC®), em comparação com o grupo placebo, durante 12 semanas (62). Neste estudo foi evidenciado que o consumo de probióticos reduziu significativamente a incidência de infeções respiratórias superiores e sintomas semelhantes aos da gripe, em comparação com o placebo. Verificou-se ainda um nível mais elevado de interferão gama (IFN- γ) sérico em comparação com o grupo placebo e com os valores base. Assim, é possível concluir que estas três estirpes probióticas reduzem a incidência de infeções no trato respiratório superior, provavelmente por influenciarem positivamente os níveis de IFN- γ no sangue.(62)

As doenças infecciosas são a causa mais importante de morbidade em crianças, sendo as mais comuns as infeções respiratórias e gastrointestinais.(58,63)

Nos últimos anos, vários ensaios clínicos foram realizados para avaliar a utilização de probióticos na prevenção de infeções do trato respiratório em crianças.(58,63) Uma meta-análise recente, concluiu que os probióticos reduzem o risco de infeções do trato respiratório, no entanto, esta meta-análise incluiu todas as faixas etárias, não foi específica para determinadas estirpes e não foi estratificada com base no tipo de probióticos usados.(58)

Com base em ensaios clínicos bem elaborados em crianças, o LGG foi utilizado em 3 estudos, envolvendo um total de 1375 crianças e em todos os estudos foram verificados efeitos positivos na redução da incidência de infeções do trato respiratório. Outra bactéria, neste caso *B. animalis* subsp. *lactis*, foi analisada em 4 estudos, tendo sido observados efeitos negativos em todos.(58)

No estudo com 194 crianças com infeção respiratória foi observado que o consumo de leite suplementado com LGG, durante 28 semanas, reduziu modestamente o número de dias de sintomas respiratórios, apesar de não ter efeitos significativos sobre a carga viral.(64)

Uma meta-análise focada na eficácia dos probióticos na prevenção de infeções agudas do trato respiratório superior, analisou 10 ensaios clínicos, que incluíram 3451 indivíduos, verificando que os probióticos reduzem a incidência destas infeções. Dois outros estudos constataram que os probióticos reduziram a duração e a gravidade dos sintomas semelhantes aos da gripe em crianças. No entanto, estas evidências não são suficientes para o aconselhamento de probióticos nestas infeções. É importante fornecer informação clara acerca das estirpes usadas, das doses eficazes, para definir qual a população alvo e quais os efeitos esperados.(52)

Existe então a questão pertinente de se recomendar o uso rotineiro de probióticos a todas as crianças que apresentem risco elevado de infeção respiratória. Tendo em conta as evidências atualmente disponíveis, parece prudente usar estirpes com eficácia comprovada em mais de 2 estudos, como é o caso do LGG.(58)

- **Aplicações otológicas em crianças**

A otite média aguda é uma das doenças mais comuns na infância, afetando aproximadamente 70% das crianças com 2 anos de idade e 20 a 30% destas sofrem de otites recorrentes.(65)

O tratamento desta doença passa pela utilização de antibióticos, no entanto, uma antibioterapia de rotina pode ter efeitos negativos a longo prazo, como o desenvolvimento de resistências, sendo a utilização de probióticos uma alternativa de tratamento.(65) Foi relatado que o uso de probióticos reduziu a incidência de otite média aguda, tendo sido mais evidente com a utilização do género *Lactobacillus* em comparação com *Streptococcus* (64). Num estudo realizado em crianças, com a aplicação de *S. salivarius* em spray, foi demonstrada uma diminuição de episódios recorrentes de otite média aguda de 43% para 13%. Noutro estudo houve também evidência da redução da proporção de episódios de otite média aguda, num estudo de 6 meses com a administração de leite suplementado com *Lactobacillus salivarius*, de 70% para 36%.(64)

Ainda noutro estudo, foi selecionada a estirpe *Lactobacillus salivarius* PS7, tendo demonstrado forte atividade antimicrobiana contra os agentes patogénicos presentes no ouvido médio, com uma dose diária de 1×10^9 UFC. Os resultados obtidos foram comparados com os mesmos dados obtidos nos 6 meses anteriores ao tratamento com

probiótico, demonstrando que existe potencial preventivo na administração desta estirpe probiótica, havendo redução do número de episódios de otite média em crianças. (65)

As evidências sugerem que o consumo de probióticos reduziu o uso de antibióticos e de outras infeções para além da otite média aguda.(64)

- **Rinite alérgica**

A rinite alérgica é uma das doenças mais comuns em todo o mundo, afetando 10 a 50% da população geral, sendo caracterizada por respostas inflamatórias mediadas por IgE na mucosa nasal.(66,67)

A utilização de probióticos irá influenciar a resposta de células T auxiliares tipo 1 (Th1) e a predominância de células Treg, alterando a microbiota intestinal direta ou indiretamente no tecido linfóide associado ao intestino.(68) Estudos *in vitro* sugeriram que estirpes de *Lactobacillus* demonstram capacidade para modular o equilíbrio da resposta Th1/Th2 no sistema imunitário.(68)

Uma meta-análise de 22 estudos concluiu que a utilização de probióticos, especialmente *L. paracasei*, tem um efeito benéfico clínico e imunológico no tratamento da rinite alérgica.(64)

Num estudo cruzado realizado em crianças com rinite alérgica perene, a administração de probióticos num período de 12 semanas, em comparação com a administração de levocetirizina isolada, evidenciou melhoria dos sintomas.(68)

- **Aplicações na cavidade oral**

A cavidade oral não é um ambiente homogéneo para a microbiota residente, mas apresenta vários habitats distintos para a colonização microbiana, como os dentes, o sulco gengival, a língua, as bochechas, os lábios e o palato duro e mole. A microbiota oral contribuí para o bem-estar oral e geral, a sua perda pode ser prejudicial para a saúde do hospedeiro. (69)

As alterações na homeostase da cavidade oral, a ingestão prolongada de antibióticos ou a alteração no mecanismo de defesa do hospedeiro, influenciam o

crescimento e colonização de *C. albicans*, que resulta na transformação da forma saprófita de *C. albicans* em forma parasitária.(70)

O microbioma oral também tem sido estudado no contexto da estomatite aftosa recorrente que é caracterizada por ulcerações dolorosas. O tratamento atual é principalmente sintomático, com o objetivo de aliviar a dor, promover a cicatrização das úlceras e tentar evitar o seu reaparecimento.(71)

Numa metanálise de 2020, foi avaliada a eficácia dos probióticos quando utilizados isoladamente ou como adjuvante no tratamento com outros medicamentos, em comparação com o grupo placebo, no que diz respeito à gravidade das úlceras e à dor.(71) Várias estirpes dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram estudadas, tendo sido *Lactobacillus brevis* CD2 e *Bacillus clausii*, as que apresentaram maior evidência de promoção da cicatrização de úlceras e de redução de dor oral, sendo no entanto, necessários mais estudos que demonstrem a sua eficácia a longo prazo.(71)

- Gengivite e periodontite

Como mencionado anteriormente, os géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são os mais usados como probióticos para melhorar a saúde gastrointestinal, no entanto, existe ainda pouca informação acerca do seu efeito em infeções orais comuns, como a cárie dentária.(72)

As estirpes de *Lactobacillus* são as mais estudadas e as que apresentam maiores evidências na inibição de microrganismos patogénicos como *S. mutans*.(72) As estirpes *L. paracasei* 11.6, *L. paracasei* 25.4, *L. fermentum* 20.4 e *L. paracasei* 20.3 são as que apresentam atividade antibiofilme contra *S. mutans*. A identificação destas estirpes que existem naturalmente na cavidade oral e que apresentam atividade antimicrobiana contribui para o desenvolvimento de novos probióticos para prevenir a cárie dentária.(72)

A utilização de probióticos tem sido estudada como alternativa ao colutório de clorhexidina. Uma revisão sistemática de 2016, onde 8 estudos realizaram a comparação entre o colutório com clorhexidina e o colutório com probióticos, concluíram que existem melhoras significativas no índice gengival e sendo o índice de placa semelhante. O benefício clínico em comparação com o placebo também foi demonstrado na administração, durante 8 semanas, de comprimidos contendo *Lactobacillus* liofilizados.(64)

Embora existam meta-análises e ensaios robustos consideráveis para a eficácia a curto prazo dos probióticos em algumas condições inflamatórias da cavidade oral, auditiva e nasal, mais estudos são necessários para a avaliação de resultados a longo prazo.(64)

- **Infeções nosocomiais em crianças**

As infeções nosocomiais, ou infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS) são infeções adquiridas em meio hospitalar ou instituições de prestação de cuidados de saúde, desenvolvendo-se durante o período de internamento, não estando presentes no momento da admissão(58). Em pediatria, mesmo nos países desenvolvidos, a incidência de IACS varia entre 5% a 10%, sendo as infeções gastrointestinais e do trato respiratório as responsáveis pela maioria delas. Estas infeções têm vários efeitos negativos, desde agravar os sintomas e limitar o resultado do tratamento, passando pelo prolongamento do tempo de internamento até ao aumento dos custos hospitalares. Novas estratégias para o controlo destas infeções estão em estudo, sendo uma delas o uso de probióticos.(58,73)

Recentemente a ESPGHAN WG, realizou uma revisão sistemática sobre o papel dos probióticos na prevenção da diarreia com origem hospitalar (73). Esta meta-análise identificou 8 estudos, dos quais 3 investigaram o impacto de LGG, evidenciando que a administração deste probiótico reduziu o risco de diarreia de 13,9% para 5,2% no ambiente hospitalar. Pelo contrário, a ação da bactéria *L. reuteri* DSM 17938 foi investigada em 2 estudos, obtendo em ambos resultados negativos. Assim, a recomendação da ESPGHAN WG caso seja considerada a utilização de probióticos, é a utilização de LGG, pelo menos numa dose de 10^9 UFC/dia, durante o internamento.(58,73)

A bactéria LGG, em terapia conjunta com micronutrientes como a vitamina B e C e zinco, fornecem grande benefício na redução do risco de diarreia em crianças hospitalizadas.(53)

No que diz respeito às infeções do trato respiratório no âmbito IAC, ainda não há evidências suficientes para recomendar probióticos na sua prevenção.(58)

- **Doente crítico**

Dados recentes mostram que a microbiota intestinal de doentes internados em unidades de cuidados intensivos (UCI), sofre uma rápida alteração de um estado saudável, para um estado de disbiose. As amostras fecais de pacientes em UCI mostram menor quantidade relativa de *Firmicutes* e maior quantidade relativa de *Proteobacteria*, tendo sido também observadas reduções em microrganismos como a bactéria do género *Faecalibacterium*, que conferem benefícios anti-inflamatórios (74). Nestas unidades é feito um grande esforço para a erradicação de bactérias, fungos ou vírus. Apesar da ampla disseminação da terapia com antibióticos e dos avanços na assistência hospitalar, a infeção e a sepsis continuam a ser as principais causas de morbidade e mortalidade nas unidades de cuidados intensivos.(74,75)

No doente crítico as alterações na homeostase intestinal estão associadas ao aumento da produção de citocinas inflamatórias, à disfunção da barreira intestinal e ao aumento da apoptose celular, o que pode levar à falência de múltiplos órgãos.(75)

Neste ponto, a questão crucial está relacionada com a hipótese de poder direcionar o foco para o tratamento da disbiose, restaurando o microbioma normal e saudável, com o objetivo de combater a infeção e melhorar a recuperação na UCI. No entanto, um obstáculo ao uso de terapias probióticas em UCI, é a falta de modelos animais que identifiquem os mecanismos moleculares específicos que medeiam a ação dos probióticos em estados de doença aguda. Cada espécie, sub-espécie ou estirpe probiótica deve ser analisada no contexto de uma doença crítica para determinar os mecanismos benéficos.(74)

O uso de probióticos tem sido alvo de vários ensaios clínicos e meta-análises, muitos deles focaram o seu objetivo na verificação do papel dos probióticos na redução da pneumonia associada à ventilação mecânica.(75) Uma meta-análise de 28 estudos realizados até ao final do ano de 2014, avaliando a terapia probiótica em UCI, evidenciou uma redução significativa das infeções após doença crítica e uma tendência de redução da pneumonia associada à ventilação mecânica. Como nestes ensaios foi usada uma ampla gama de espécies e doses de probióticos, não é feita nenhuma recomendação de utilização, apenas uma exclusão do probiótico *S. boulardii*, que foi considerado inseguro em pacientes em UCI.(74)

Mais ensaios clínicos são necessários para a possibilidade de recomendação do uso de probióticos e confirmação dos seus benefícios em pacientes em UCI.(74)

- **Saúde do trato urogenital feminino**

A vaginose bacteriana é um dos problemas do sistema genital feminino mais comum em mulheres em idade fértil. Os microrganismos causadores destas infeções podem fazer parte da microbiota vaginal normal e são encontrados em cerca de 33% das mulheres sexualmente ativas. Em geral, a prevalência de vaginose bacteriana é de 30% a 35%.(52)

As espécies bacterianas do género *Lactobacillus* predominam na microbiota vaginal normal, criando um biofilme na superfície da mucosa vaginal, que protege contra microrganismos patogénicos, por diferentes mecanismos como, a secreção de ácidos orgânicos, produção de substâncias antibacterianas, competição por nutrientes, coagregação, estimulação do sistema imunológico e exclusão da adesão do epitélio. No entanto, esta estabilidade existente pode ser afetada pelo uso de antibióticos, atividade sexual e alteração hormonal.(62)

Os microrganismos frequentemente implicados na vaginose bacteriana são: *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma hominis* e bactérias anaeróbias, especialmente *Porphyromonas* spp.. Acredita-se que esta condição pode ter origem num desequilíbrio entre as bactérias benéficas (*Lactobacillus*) e as bactérias anaeróbias Gram-negativas. Sendo assim, o uso de probióticos poderá ser um tratamento alternativo à utilização de antibióticos.(52)

Estudos evidenciaram que a restauração da microbiota vaginal e/ou modulação da resposta imune da mucosa vaginal, pode ser alcançada através do consumo de probióticos, que podem ser administrados por via oral, intravaginal ou aplicados topicamente.(62)

Atualmente é referido que os probióticos têm que apresentar duas características para serem usados na vaginose bacteriana, nomeadamente a permanência no hospedeiro sem causar efeitos adversos e inibição de patogéneos geniturinários para apoiar ou criar um efeito terapêutico.(52)

A administração oral de *Lactobacillus hilus* ou a administração vaginal de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus fermentum* 14-RC foi associada aos efeitos mais benéficos no aumento do número de lactobacilos vaginais, no restabelecimento da microbiota vaginal normal e também com o tratamento da vaginose bacteriana.(52)

Em relação à aplicação a nível tópico, foi estudada a aplicação de gel de sacarose em comparação com um gel contendo o antibiótico metronidazol. Foi evidenciado que a sacarose promove o crescimento de *Lactobacillus*, que por sua vez produzem ácido láctico que reduz o pH vaginal e secretam substâncias antibacterianas, inibindo a adesão e replicação das bactérias anaeróbias patogénicas. Pelo contrário, o gel contendo metronidazol inibe o crescimento tanto de bactérias patogénicas como de benéficas.(62)

Foi demonstrada a capacidade dos probióticos como suplemento complementar não químico, em conjunto com os antibióticos para preservar e restaurar a microbiota vaginal normal, indicando que os probióticos, especialmente *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus fermentum* 14-RC, podem ser eficazes na restauração da microbiota vaginal normal e na prevenção da recorrência de vaginose bacteriana, quando administrados numa dose diária de mais de 1×10^8 UFC, por um período de 2 meses.(52)

- **Distúrbios intestinais funcionais**

O crescente interesse e reconhecimento da importância da microbiota intestinal nos distúrbios intestinais funcionais e as crescentes evidências desta importância, aumentaram o interesse na manipulação da microbiota para o tratamento desses distúrbios.(76)

Um fator importante e que auxilia no diagnóstico, é a cronicidade dos sintomas, que permite distinguir de condições agudas, transitórias e autolimitadas. Os critérios de diagnóstico mais usados têm como requisito, a presença de sintomas típicos por pelo menos 6 meses antes do diagnóstico. São distúrbios com maior prevalência nos países ocidentais, sendo a síndrome do intestino irritável (SII) a mais prevalente.(76)

Os probióticos podem ajudar a restaurar a homeostase da microbiota intestinal, conduzindo a uma melhor função digestiva e intestinal, e possivelmente a uma melhora

dos sintomas gastrointestinais.(76) No entanto, comparar estudos individuais usando probióticos torna-se difícil devido à seleção heterogénea de pacientes, às diferenças nas espécies probióticas, às dosagens e à dieta, e também às diferenças no desenho dos estudos e nos resultados relatados.(76) A qualidade da evidência para uma intervenção probiótica específica deve ser baseada no número de estudos com determinada estirpe ou produto probiótico específico, na qualidade dos estudos, na consistência dos resultados entre os diferentes estudos e na aplicabilidade clínica dos mesmos.(76)

- **Síndrome do intestino irritável**

A SII é um distúrbio funcional intestinal que se manifesta por dor e desconforto associados à defecação ou a uma mudança nos hábitos intestinais. É uma doença crónica e é uma das doenças mais comuns do sistema digestivo, ocorrendo em mais de 20 % da população adulta.(77) A ausência de um mecanismo aceite para a doença e a existência de heterogeneidade de modelos de doença, impossibilitam a compreensão da patogénese, diagnóstico e tratamento da mesma.(77) Apesar disto, sabe-se que uma das causas da doença é a alteração da microbiota intestinal, resultando em má absorção de ácidos biliares e aumento da secreção de fluído e muco, o que provoca diarreia. As bactérias probióticas dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, desenvolvem um papel importante na conjugação dos ácidos biliares no intestino, de modo a diminuir a quantidade de ácidos que atinge o intestino grosso, e assim reduzir a gravidade da diarreia e o desconforto do paciente. A eficácia dos probióticos foi confirmada em ensaios clínicos recentes, tendo sido demonstrado que o tratamento com *Lactobacillus plantarum* 299 V, reduziu significativamente os principais sintomas da SII, como dor abdominal, desconforto e inchaço. Foi também avaliada a atividade da bactéria *E. coli* Nissle 1917 na SII, verificando-se que este suplemento de longo prazo utilizando este probiótico causou uma melhora de 20% em comparação com o grupo placebo.(8)

- **Doença inflamatória intestinal (DII)**

A DII é uma doença crónica do trato gastrointestinal, que inclui dois tipos principais, a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Estas doenças envolvem lesões específicas em diferentes partes do trato gastrointestinal. A etiologia não é bem conhecida, podendo incluir um processo autoimune em pessoas geneticamente predispostas, e também estar relacionada com uma resposta imunológica alterada devido a modificações na microbiota intestinal.(8,52)

Foram indicados três mecanismos possíveis para os efeitos dos probióticos na DII: os probióticos secretam substâncias letais para as bactérias patogénicas, competindo com os agentes patogénicos pela ligação ao epitélio intestinal; os probióticos modulam a inflamação causada pelos agentes patogénicos, prevenindo a produção de citocinas inflamatórias, fortalecendo o sistema imunológico; os probióticos regulam a homeostase do epitélio gastrointestinal, aumentando a sobrevivência das células epiteliais intestinais, aumentando a função do ducto epitelial e estimulando respostas protetoras.(52)

A doença de Crohn, é caracterizada pela inflamação crónica do sistema gastrointestinal, sendo mais afetada a parte terminal do íleo. Apesar da patogénese ainda não estar explicada, foram determinados três fatores que podem estar na sua génese, a alteração anormal da microbiota intestinal, resposta imunológica alterada e predisposição genética(8).

A incidência de DC na Europa é estimada em 13 pessoas por 100.000, por ano.(78) Não existe cura conhecida para esta doença e o tratamento é dirigido para a indução e manutenção da remissão, tendo em conta a desnutrição, as complicações associadas e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.(78) Ensaios clínicos utilizaram os probióticos *Lactobacillus* GG, na dose de $1,2 \times 10^{10}$ UFC, tendo sido a recorrência dos sintomas de 16% enquanto que no grupo placebo foi de 10%. Não havendo outras evidências documentadas, os resultados sugerem que o efeito benéfico dos probióticos no tratamento e prevenção de recaídas na DC é discutível.(8)

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória crónica da membrana mucosa do reto ou do reto e cólon, levando, em alguns casos, a necrose, ulceração e perfuração do intestino. Tem maior prevalência entre os 20 e os 40 anos, sendo mais comum na América do Norte e Europa. Uma preparação de 8 microrganismos probióticos diferentes, designada VSL#3 (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*,

B. breve, *B. longum*, *B. infantis* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), foi testada nesta doença.(8,54)

Num estudo realizado em crianças com idades entre os 2 e os 16 anos, após tratamento de um ano com probióticos, a recorrência dos sintomas foi observada em 21% dos pacientes, enquanto no grupo placebo a taxa era de 73 %. Com a administração do VSL#3, em pacientes adultos, com uma carga de de $3,6 \times 10^{12}$ UFC, duas vezes ao dia, foi relatada uma melhoria em 43% dos pacientes, após 12 semanas de tratamento(8). Outro microrganismo com atividade positiva no tratamento da colite ulcerativa, é a bactéria *E.coli* Nissle 1917. A sua eficácia foi comparada com a do medicamento anti-inflamatório administrado no tratamento desta doença, a messalazina, e foram obtidos resultados semelhantes, ao fim de um ano de tratamento, 64% de eficácia para o tratamento com probióticos e 66% para o tratamento com messalazina.(8)

Uma abordagem proposta é identificar e desenvolver estratégias dietéticas para impulsionar o crescimento e a eficiência dos microrganismos comensais endógenos ou diminuir a atividade de bactérias nocivas. Por exemplo, prebióticos como a inulina ou oligossacarídeos de frutose, aumentam o número de *Bifidobacterium* spp. e os níveis de AGCC como principais produtos metabólicos para as células epiteliais do cólon. Pelo contrário, os açúcares refinados e aditivos alimentares, podem aumentar a proliferação de estirpes bacterianas prejudiciais, incluindo *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*.(52)

Uma possível abordagem terapêutica é proporcionar a melhora clínica rápida e cicatrização da mucosa com corticosteróides e tratamento biológico com probióticos e/ou prebióticos para promover a recuperação. No entanto, esta hipótese permanece não estudada, sendo apenas, por enquanto, uma perspetiva de futuro.(52)

- **Infeção por *Helicobacter pylori***

Helicobacter pylori é uma bactéria Gram-negativa que coloniza a mucosa do duodeno e está envolvida no desenvolvimento de doenças como a gastrite crónica, a úlcera péptica, carcinoma e linfoma gástrico.(79)

A infeção causada pela bactéria *Helicobacter pylori*, atinge cerca de metade da população mundial(53). A terapia mais comum na erradicação desta bactéria são os

antibióticos e os inibidores da bomba de prótons(53,80). No entanto, devido aos potenciais efeitos adversos, menor adesão e custo dos medicamentos, outras alternativas são estudadas. Os probióticos devido às suas estratégias de produção de substâncias antibacterianas, serão uma alternativa eficaz para erradicar esta infeção. Os AGCC, como o ácido láctico, o ácido acético e o ácido butírico modulam o valor de pH do estômago, enquanto que as bacteriocinas têm atividade antibacteriana contra esta bactéria.(53)

Num estudo realizado em crianças, o tratamento complementar com *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55730), conduziu a uma diminuição significativa nos sintomas da infeção, como a dor epigástrica, halitose, azia, vômitos e distúrbios de defecação(53,80). No entanto, não foram observadas diferenças na taxa de erradicação, em comparação com o grupo placebo.(53,80)

Um estudo revelou que a utilização de uma mistura de probióticos contendo *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *B. infantis*, *B. breve* e *S. thermophilus* teve um impacto positivo na redução dos efeitos adversos associados à administração de antibióticos e que a taxa de erradicação da infeção foi 30% maior em comparação com o grupo placebo. No entanto, não existe evidência de erradicação efetiva completa da infeção.(53)

- **Aplicações na pele**

Os probióticos podem potenciar benefícios à saúde do hospedeiro através do consumo oral e aplicação local.

A pele tem um papel muito importante no organismo humano, funciona como barreira física e química para proteger o corpo contra agressões externas e cobre toda a superfície do corpo.(81) Entre as suas funções podemos mencionar a regulação da temperatura corporal, o controlo da taxa de evaporação, o armazenamento de lípidos e água. Na pele existem vários microrganismos como bactérias, fungos e vírus, que são classificados em espécies residentes, temporárias e transitórias. Os microrganismos residentes são benéficos para a pele, os transitórios são definidos como contaminantes mas com baixa capacidade de proliferação, permanecendo pouco tempo na pele.(62)

Diferindo de todas as outras áreas estudadas do microbioma, a pele possui a maior diversidade de variáveis que influenciam as características de superfície e uma grande

variedade de tipos celulares, existindo diferentes microambientes que são influenciados constantemente pelo ambiente externo e pelo sistema imunológico do hospedeiro.(81)

Manter a microbiota da pele inalterada pode ser uma forma eficaz de manter as funções normais da pele saudável. No entanto, as doenças de pele podem alterar a ecologia microbiana.(62)

- **Dermatite atópica**

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crónica da pele, recorrente e não contagiosa, com um impacto económico e social consideráveis. A DA é caracterizada por prurido, eritema e ressecamento da pele (xerose) que pode formar crostas ou descamar.(82–84)

A sua prevalência aumentou consideravelmente nos últimos anos, estando entre os 2% e 10% em adultos, e entre os 15% e 30% em crianças.(82)

O mecanismo subjacente e a etiologia da DA permanecem por esclarecer. É um problema de pele complexo causado por uma interação entre a suscetibilidade genética e fatores ambientais pré-natais/pós-natais.(85)

Uma das causas que pode estar na origem da DA é a mutação na proteína filagrina, componente essencial da barreira epidérmica, que vai comprometer o estado de barreira da pele, causando perda de água, aumento de xerose e permitindo a entrada e o CONTACTO com alérgenos e agentes irritantes.(81,82) Do ponto de vista imunológico, existe um desequilíbrio entre as células Th1 e Th2, aumentando a produção de interleucinas e IgE, conduzindo a um processo inflamatório.(82)

A microbiota da pele tem como principal função promover a homeostase da pele, influenciando a inflamação e o sistema imunológico. A microbiota da pele é influenciada por fatores como humidade, temperatura, pH, concentração de lípidos, dieta, medicamentos, procedimentos cirúrgicos e stress físico e psicológico(82). São detetadas nas regiões mais húmidas e oclusivas os géneros bacterianos *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, enquanto nas zonas com mais gordura predomina o género *Propionibacterium*. Normalmente, as espécies de bactérias patogénicas que invadem a barreira cutânea são: *S. aureus* e *P. aeruginosa*.(84) Estima-se que nos pacientes com

DA, mais de 90% dos casos tanto de pele lesionada como não lesionada, a mesma esteja colonizada por *S. aureus*.(86)

A DA representa a primeira reação alérgica que se manifesta na infância e é reconhecida como um precursor para o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade, como alergias alimentares, asma e rinite alérgica. As diretrizes de tratamento clássico para DA incluem o tratamento tópico hidratante, corticosteróides tópicos e anti-histamínicos. Outros tratamentos usados são os inibidores de calcineurina tópicos, corticosteróides orais nos casos mais graves, antibióticos tópicos para tratar lesões infetadas, fototerapia e tratamentos biológicos.(82,85)

A variável validada mais usada para avaliar as lesões da dermatite atópica é o índice *Scoring Atopic Dermatitis* (SCORAD), que consiste num indicador que pontua a extensão das lesões pela área total de superfície corporal, atribuindo uma percentagem indicativa para cada área do corpo, avalia também a intensidade de cinco lesões principais (0 a 3 pontos): eritema, edema, exsudado, escoriação e liquenificação e, por fim, avalia os sintomas subjetivos causados pelas lesões, como o prurido e perda de sono.(82)

Num estudo foi testado um probiótico composto por *B. lactis*, *B. longum* e *L. casei*, administrados por 12 semanas, tendo sido alcançada uma redução no índice SCORAD de 80% no grupo probiótico(82). Na microbiota intestinal, observou-se um aumento dos géneros *Bacteroides*, *Ruminococcus* e *Bifidobacterium* enquanto a população de *Faecalibacterium* diminuiu após o consumo de probióticos.(82)

Num estudo foram avaliados os efeitos preventivos de *L. rhamnosus* LPR, *B. longum* BL999 e *L. paracasei* ST11, durante 2 meses antes e 2 meses depois do término da administração dos probióticos, tendo sido relatados menos casos de DA em bebés cujas mães receberam suplementos probióticos, em comparação com o grupo placebo (85).

Existem estudos que consideram o uso de probióticos ineficaz no tratamento da DA, sendo os que apoiam, muito limitados (85,86).

Schmidt *et al.*(2019), realizaram um estudo utilizando a suplementação com LGG e Bb-12, observando-se menor incidência de DA (4,2%) no grupo probiótico em comparação com o grupo placebo (11,5%).(86)

Uma quantidade restrita de evidências sugere que os probióticos podem diminuir a gravidade da DA. Um estudo aleatório, duplo-cego e controlado por placebo investigou

os efeitos da utilização da estirpe *L. plantarum* CJLP133 na prevenção de sintomas de DA. O estudo foi realizado por um período de 12 semanas entre crianças com idades entre 1 e 12 anos (85). Verificou-se que houve uma diminuição nas contagens de IFN- γ , eosinófilos e Interleucina-4.(85) Outro estudo semelhante, investigou o uso de *L. paracasei* (LP), *L. fermentum*(LF), e LP + LF juntos em crianças, havendo uma redução dos sintomas de DA (85,87). Ainda noutro estudo, compararam os resultados com crianças que receberam como suplemento *L. sakei* com as crianças que receberam placebo e verificou-se que o consumo do suplemento de *L. sakei* foi associado à melhoria clínica substancial com diminuição concomitante dos níveis de quimiocina. Meta-análises anteriores que avaliaram os efeitos dos probióticos no tratamento da DA mostraram resultados inconsistentes. Apesar dos probióticos melhorarem significativamente o índice SCORAD em crianças com 1 ano ou mais, o significado clínico não é consistente e o papel dos probióticos não está ainda bem estabelecido.(85)

Vários outros estudos foram realizados, podendo concluir-se que o tratamento probiótico que teria maior eficácia na DA, deveria incluir estirpes de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (uma combinação de estirpes) e ter a duração de pelo menos 12 semanas.(82)

Em relação à utilização de probióticos tópicos na DA, estes demonstraram a capacidade de aumentar as ceramidas da pele, melhorar o eritema, descamação e prurido e diminuir a população de *S. aureus* patogénico.(84) Um estudo realizado em 2017, onde a estirpe *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (designada por La1) foi extensivamente estudada pela sua capacidade de inibir agentes patogénicos, a fixação de células epiteliais e a imunomodulação, evidenciou que a La1 pode aderir aos queratinócitos e prejudicar a adesão de *S. aureus*.(88) Neste estudo, foi demonstrado o efeito benéfico e melhora das lesões de DA, para a utilização de uma loção constituída por La1 inativadas pelo calor, existindo a necessidade de uma investigação mais aprofundada nesta área.(88)

Na tabela 2 são apresentados, em resumo, os probióticos recomendados e as suas aplicações clínicas.

Tabela 6.1 - Probióticos e aplicações clínicas

Probióticos	Aplicações Clínicas	Referências
<i>L. casei</i> <i>Lactobacillus</i> GG <i>S. bouardii</i>	Diarreia Infeciosa Aguda na Criança	8
<i>Lactobacillus</i> GG <i>S. bouardii</i> CNCM I-745	Diarreia Associada a Antibióticos	8, 55, 57
<i>S. bouardii</i>	Diarreia do Viajante	8
<i>Lactobacillus</i> GG	Infeções do Trato Respiratório	58
<i>Lactobacillus salivarius</i> PS7	Aplicações Otológicas em Crianças	64, 65
<i>L. paracasei</i>	Rinite Alérgica	64
<i>Lactobacillus brevis</i> CD2 <i>Bacillus clausii</i>	Aplicações na Cavidade Oral (cicatrização de úlceras e alívio de dor)	71
<i>L. paracasei</i> 11.6 <i>L. paracasei</i> 25.4 <i>L. fermentum</i> 20.4 <i>L. paracasei</i> 20.3	Gengivite e Periodontite	72
<i>Lactobacillus</i> GG	Infeções Nosocomiais em Crianças	73
Vários estudos mas sem recomendação de utilização	Doente Crítico	74
Administração oral <i>Lactobacillus hilus</i>	Trato Urogenital Feminino	52
Administração vaginal <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> 14-RC		
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299 V		
<i>Lactobacillus</i> GG	Síndrome do Intestino Irritável	8
<i>Lactobacillus</i> GG	Doença de Crohn	8
VSL3 (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> e <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>) <i>E. coli</i> Nissle 1917	Colite Ulcerativa	8, 54
Combinação (<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i> e <i>S. thermophilus</i>)	Infeção por <i>Helicobacter pylori</i>	53
Combinação de estirpes de <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533 (tópico)	Dermatite Atópica	82, 88

7. Segurança e Riscos

A introdução de novas estirpes sem documentação de segurança estabelecida é necessária avaliar com os procedimentos estabelecidos, a sua segurança e eficácia antes da sua utilização em produtos probióticos.(5)

Um probiótico deve ser seguro para o uso a que se destina, conforme estipulado pelas autoridades reguladoras para a categoria do produto(89). Os probióticos podem ser categorizados segundo a sua utilização em i) alimentos probióticos, ii) suplementos alimentares ou medicamentos.(89)

Esta variedade de apresentações comerciais dos probióticos, tornou-se num desafio para o consumidor e também para o profissional de saúde, desde a seleção do produto mais apropriado, na aplicação mais apropriada e até à adequação a cada pessoa. A utilização de probióticos prescritos pelo médico representa uma pequena fração do consumo total de probióticos, verificando-se que a maioria dos produtos é adquirida pela população em geral, por auto-aconselhamento ou pelo aconselhamento farmacêutico. Deste modo, os probióticos servem essencialmente como suporte profilático ou de saúde, ficando o seu potencial terapêutico subestimado.(36)

As estruturas reguladoras para probióticos ou alimentos contendo probióticos, são distintas nas diferentes partes do mundo. Na Europa, os probióticos, alimentos ou suplementos alimentares, não podem mencionar os benefícios para a saúde das estirpes que os constituem.(36)

A segurança dos probióticos deve ser avaliada para as condições pretendidas de utilização. Existem assim fatores que devem ser considerados, como as propriedades inerentes do microrganismo, o estado de saúde do consumidor, a dose a administrar e também a possibilidade do probiótico constituir uma potencial fonte de genes, incluindo genes de resistência ou de virulência, que podem ser transferidos para a microbiota intestinal.(89)

A predominância de evidências, incluindo a longa história de uso seguro de probióticos, bem como os dados de ensaios clínicos e estudos em animais e *in vitro*, apoiam o pressuposto de que os probióticos são geralmente seguros para a maioria das populações.(90)

A designação da US Food and Drug Administration (FDA) “Generally Recognized as Safe” (GRAS) foi aplicada a determinados microrganismos probióticos quando adicionados a alimentos, embora poucos estudos de segurança tenham sido feitos, especialmente em populações vulneráveis.(90)

Em 2011, a Agency for Healthcare Research and Quality, emitiu um relatório com base numa revisão exaustiva da literatura, onde concluiu que embora os ensaios clínicos existentes com probióticos não revelassem nenhuma evidência de risco aumentado, os mesmos não são suficientes para garantir uma intervenção com confiança.(90)

Deve considerar-se que tal como duas estirpes probióticas não têm o mesmo efeito clínico, cada estirpe, incluindo as que ainda não foram desenvolvidas, terão um perfil de segurança diferente. A segurança de um produto probiótico disponível comercialmente, depende não apenas do microrganismo probiótico, mas também dos restantes constituintes do produto, seja um alimento ou um medicamento.(90)

A correta identificação das estirpes é extremamente importante para a segurança, condições de crescimento e propriedades metabólicas de cada estirpe. A sua classificação taxonómica também é importante no momento da preparação do probiótico, uma vez que essa informação é crucial para a avaliação da estabilidade da estirpe e para comparar com outras estirpes isoladas em caso de infeção.(91)

É possível inferir teoricamente alguns riscos associados à utilização de probióticos, como infeções sistémicas, atividades metabólicas nocivas, estimulação imunológica excessiva em indivíduos suscetíveis, transferência de genes e efeitos colaterais gastrointestinais. São necessários mais estudos que investiguem adequadamente a incidência e a gravidade dos efeitos adversos relacionados com os probióticos.(5,90)

Neste seguimento e para a avaliação da segurança dos probióticos, a “Organização Mundial de Saúde” (OMS), sugeriu uma série de testes, como produção de toxinas, potencial hemolítico, resistência a antibióticos e análise de atividades metabólicas e salientou ainda a necessidade de realizar uma supervisão dos consumidores pós-comercialização e o estudo das aplicações de probióticos em animais imunocomprometidos para determinar a sua infetividade.(92)

As infeções podem ocorrer devido à translocação de bactérias endógenas viáveis do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea. Como consequência adversa da administração de probióticos, foram relatados casos de bacterémia, sepsis, fungémia, endocardite, meningite, endometrite, peritonite e pneumonia. Uma recente revisão sistemática de 60 casos clínicos, com 93 pacientes, constatou que a infeção fúngica foi a complicação infecciosa mais comum, com 35 (37,6%) dos casos afetados, principalmente devido ao género *Saccharomyces*. As bactérias *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram responsáveis por causar bacterémias, com 26 (27,9%) e 12 (12,8%) casos afetados, respetivamente.(93)

A incidência de bacterémia causada por bactérias lácticas é muito baixa (*Lactobacillus* – 0,1% e *Leuconostocs* <0,01%), em comparação com outras causadas por *Enterococcus* (5 – 15%). A maioria dos casos clínicos em que as estirpes de bactérias lácticas estão associadas, são principalmente as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* e também, *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum*. As infeções causadas por *Lactobacillus* foram observadas principalmente em hospedeiros imunocomprometidos, portadores de patologias como o vírus da imunodeficiência humana, leucemia, diabetes, entre outras.(5)

O sistema imunológico de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos pode reagir de maneira diferente às bactérias probióticas. Por exemplo, bactérias probióticas podem exercer um efeito estimulante sobre a fagocitose em pessoas saudáveis, enquanto em pessoas com alergias, esse efeito pode ser o oposto, provocando um estímulo imunológico excessivo. O efeito imunomodulador também pode depender da dose de probiótico usada. Apesar da falta de informação declarada sobre os probióticos prejudiciais para os indivíduos imunocomprometidos, é importante continuar com os estudos em relação a estes e à sua eficácia e segurança de utilização.(91)

Um dos efeitos metabólicos nocivos associado à utilização de probióticos, está relacionado com o facto de algumas estirpes probióticas poderem produzir a enzima hidrolase de sais biliares (BSH), o que leva à potencial acumulação de sais biliares desconjugados, posteriormente transformados pela microbiota, em ácidos biliares secundários prejudiciais (91). A acumulação destes compostos na circulação entero-hepática, pode aumentar o risco de colestase e cancro colo-retal. Contudo, os efeitos nocivos da BSH para o hospedeiro humano ainda não foram clarificados.(91)

Outro aspeto relacionado com a segurança de bactérias usadas como probióticos é a transferência potencial de genes de resistência a antibióticos entre probióticos e outras bactérias comensais ou patogénicas que ocorrem no trato gastrointestinal. Foi relatado que mais de 68% das estirpes de probióticos eram resistentes a dois ou mais antibióticos.(91)

A resistência aos antibióticos é a principal preocupação de segurança. Os probióticos não devem servir como fonte de genes de resistência a antibióticos. Esta preocupação diminui quando estes genes não são transferíveis para outras bactérias.(5)

A resistência a um determinado antibiótico pode ser intrínseca a uma espécie ou género bacteriano que permite que um organismo se desenvolva na presença de um agente antibacteriano. Pelo contrário, a resistência adquirida caracteriza algumas estirpes dentro de uma espécie, geralmente suscetível ao antibiótico em consideração e pode ser transferida horizontalmente entre as bactérias.(5)

Provar a ausência de resistência a antibióticos de uma determinada estirpe bacteriana é relativamente simples em comparação com a complexidade envolvida em provar a ausência de fatores de virulência.(94)

As bactérias lácticas possuem resistência intrínseca a alguns antibióticos, mas a maioria não é transmissível. Como exemplo, as bactérias do género *Lactobacillus*, mais especificamente as espécies *L. rhamnosus* e *L. casei*, são intrinsecamente resistentes à vancomicina, tendo sido demonstrado o seu uso seguro como probiótico.(94)

Como exemplo documentado de um efeito colateral da utilização de probióticos a nível gastrointestinal, temos a proliferação aumentada de probióticos no intestino. É proposto que os carboidratos fermentados por probióticos no intestino delgado proximal podem induzir um crescimento bacteriano muito abundante no intestino, resultando na produção excessiva de ácido láctico, no aumento da produção de gases e consequente inchaço abdominal.(93)

8. Perspetivas Futuras

Nos últimos anos, os probióticos e prebióticos têm sido alvo de atenção crescente nas áreas científica, de saúde e pública. Os estudos no âmbito do microbioma humano aumentaram a perceção em relação aos microrganismos, ampliando a visão para além do seu papel como agentes patogénicos, para uma visão mais racional, integrando uma compreensão dos papéis benéficos dos microrganismos na saúde humana e por fim o conceito de holobionte, ou seja, o funcionamento do organismo em parceria com os microrganismos que o colonizam.(95)

Tanto os probióticos como os prebióticos são cada vez mais incorporados numa ampla gama de alimentos, bebidas e produtos de aplicação tópica, em alguns casos, com validação científica questionável em relação ao benefício para a saúde do hospedeiro.(95)

Um probiótico tem de garantir a sua viabilidade e eficácia ao longo da vida útil do produto do qual é constituinte. A eficácia do mesmo vai depender da administração de uma dose adequada, esta normalmente varia entre 10^7 e 10^{11} UFC/dia, para a maioria dos estudos clínicos em humanos.(96)

Durante o período de armazenamento de probióticos, vários fatores podem afetar a viabilidade, incluindo a temperatura, o valor de pH, a atividade da água, o teor de oxigénio, o potencial redox, a presença de outras culturas ou a interação com outros ingredientes, aditivos ou materiais de embalagem. Tendo em conta os fatores citados, é defendida a necessidade de verificação de contagem de células viáveis no produto pronto e no final do tempo de vida útil.(96)

No seguimento do acima mencionado, uma possível área de exploração futura é o desenvolvimento de técnicas de controlo de qualidade, que vão além da enumeração de células viáveis, para avaliar a integridade estrutural e a atividade funcional dos probióticos. Estes ensaios poderão incluir a monitorização de processos como a produção de metabolitos e a alteração na estrutura de superfície, de acordo com o conhecimento disponível sobre os mecanismos de ação dos microrganismos probióticos.(96)

Têm sido muitos os avanços tecnológicos no que diz respeito à recolha de dados e ferramentas analíticas, com o objetivo de explorar potenciais novos candidatos a probióticos e prebióticos, bem como na obtenção de informações mais detalhadas sobre as interações com a microbiota intestinal.(95)

Um grande número de tecnologias eficientes, confiáveis e económicas foram introduzidas na pesquisa de probióticos, tornando possível estudar extensivamente genes, transcrições e proteínas de origem microbiana.(97)

Nas últimas décadas, o aparecimento da tecnologia “foodomics” (tecnologia ómica-alimentar), que integra uma série de métodos de alto rendimento, incluindo a genómica (estuda a estrutura e função do genoma), a metagenómica (estudo do metagenoma, ou seja o estudo do material genético de uma comunidade microbiana), a transcriptómica (estudo da expressão génica, ao nível do RNA), metatranscriptómica (estudo de todo o perfil de expressão génica na comunidade microbiana), a proteómica (estudo da composição proteica de uma célula, tecido ou organismo e padrões de variação) e a metabolómica (estudo quantitativo de todos os metabolitos para encontrar a relação entre metabolitos e as mudanças fisiológicas), têm sido amplamente utilizadas na ciência alimentar. Esses métodos são muito úteis para elucidar as funções dos probióticos e as interações específicas entre os probióticos e o hospedeiro. Além disso, as propriedades probióticas são específicas de cada estirpe, por isso é muito importante associar cada propriedade a uma estirpe específica.(97)

Atualmente, as abordagens ómicas têm sido aplicadas no estudo de probióticos, com o objetivo de solucionar os problemas relacionados com a segurança, qualidade, função e nutrição.(97)

Ao contrário dos probióticos, os prebióticos são usados pelos microrganismos como nutrientes, exercendo simultaneamente um efeito benéfico na saúde do hospedeiro. Os prebióticos atualmente disponíveis incluem oligossacarídeos do leite humano, lactulose e derivados de inulina(1). Os simbióticos são uma combinação de prebióticos e probióticos que têm um impacto benéfico no microbioma intestinal.(1)

Como já foi mencionado, existem limitações técnico-funcionais na utilização de probióticos, como o controlo de viabilidade, que tem dificultado as suas potenciais aplicações nos setores alimentar e farmacêutico. Deste modo, houve uma mudança de foco passando de bactérias probióticas viáveis para os chamados paraprobióticos, que são células microbianas não viáveis e/ou para biomoléculas derivadas de probióticos, os chamados pós-bióticos. Os paraprobióticos e os pós-bióticos são os conceitos emergentes no campo dos alimentos funcionais.(98)

O conceito de “pós-biótico” surge da observação de que os efeitos benéficos da microbiota são mediados pela secreção de vários metabolitos(1). Assim, pós-bióticos incluem quaisquer substâncias libertadas ou produzidas pela atividade metabólica dos microrganismos, e que vão exercer um efeito benéfico direta ou indiretamente no hospedeiro.(1)

Pós-bióticos podem incluir subprodutos metabólicos de bactérias probióticas viáveis, como o sobrenadante das culturas isento de células, vitaminas, ácidos orgânicos, ácidos gordos de cadeia curta, proteínas ou peptídeos secretados, bacteriocinas, neurotransmissores e aminoácidos; pós-bióticos derivados de flavonóides, pós-bióticos derivados de terpenóides ou pós-bióticos derivados de compostos fenólicos.(98)

Várias moléculas pós-bióticas têm despertado interesse devido à sua estrutura química conhecida, longa estabilidade de armazenamento e capacidade de desencadear vários mecanismos no controlo da inflamação, no processo de adesão de agentes patogénicos ao trato gastrointestinal, obesidade, hipertensão, doenças das artérias coronárias, cancro e stress oxidativo.(98)

Relativamente às tecnologias de produção dos pós-bióticos, o problema da padronização da dose, que existia no caso dos probióticos, aqui não se aplica. Os pós-bióticos apresentam benefícios como o tempo de vida útil maior, o armazenamento e transporte mais fáceis e menor necessidade de manter uma temperatura baixa em comparação com os probióticos. A utilização de um processo de produção repetitivo e a possibilidade de um controlo quantitativo mais preciso, são também consideradas vantagens.(1)

Em relação à questão da segurança, os pós-bióticos conseguem contornar o problema da transferência de genes de resistência a antibióticos e eliminam a necessidade de exposição a microrganismos viáveis, o que é particularmente importante em crianças com o sistema imunológico imaturo e barreira intestinal permeável.(1)

Os alimentos funcionais são definidos como alimentos com benefícios adicionais à saúde, para além do seu valor nutricional. Estes benefícios são fornecidos pela adição de, por exemplo, probióticos ou pós-bióticos. O perfil de segurança é favorável para os pós-bióticos, o que os torna candidatos ao uso em alimentos funcionais.(1)

Os alimentos fermentados são a fonte natural mais comum de estirpes de bactérias lácticas potencialmente probióticas e o seu consumo tem sido associado a benefícios de saúde significativos, mostrando potencial para o desenvolvimento futuro de probióticos.(95) O isolamento dos probióticos, para além da fonte convencional (trato gastrointestinal de uma pessoa saudável), pode ser feito a partir de fontes não convencionais, como o trato gastrointestinal de um animal, o leite materno humano, alimentos (fermentados e não fermentados), ar ou solo.(99)

Para que um produto probiótico possa ser introduzido no mercado, deve ser adequadamente caracterizado (descrição e identidade química ou microbiológica). Os procedimentos e a documentação exigidos para fazer uma solicitação de benefício à saúde para um produto probiótico ou prebiótico variam entre os diferentes países, embora haja alguns pontos em comum.(96)

Esses requisitos são associados a etapas de garantia de qualidade relevantes para garantir a dosagem adequada e a viabilidade dos probióticos e da dose de prebióticos no produto acabado.(96)

Na União Europeia, todas as alegações de saúde para alimentos ou ingredientes alimentares ativos são submetidas à Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos para pré-aprovação e, uma vez autorizadas, as alegações de um ingrediente podem ser usadas em novos produtos de acordo com as condições de utilização publicadas.(96)

9. Conclusão

Ao longo da última década, houve um grande avanço no estudo da microbiota intestinal. A ideia da importância da microbiota na saúde do hospedeiro enraizou-se, despertando um grande interesse por parte dos cientistas no estudo e pesquisa da sua constituição, funcionalidades e formas de modulação.

As técnicas de sequenciação de rRNA dos genes 16S bacterianos, permitiram caracterizar geneticamente amostras de material do trato gastrointestinal. O microbioma intestinal, sendo o conjunto de todos os genomas da microbiota, contém cerca de 150 vezes mais genes do que o genoma humano.(9,10)

Foi possível concluir que as espécies pertencentes ao género *Bacteroides*, representam cerca de 30% de todas as bactérias presentes na microbiota intestinal, existindo assim uma forte relação entre a presença destas e o bom funcionamento do organismo humano.(10)

Foi demonstrado que a composição da microbiota intestinal sofre diversas alterações ao longo da vida do hospedeiro, atingindo a estabilidade e maturidade, ou seja, semelhança com a constituição da microbiota de um adulto, aos três anos de idade. Até que a partir dos 65 anos, esta estabilidade é mais afetada do que anteriormente, observando-se uma variabilidade interindividual muito maior.(15)

A microbiota intestinal atua no organismo humano de acordo com alguns mecanismos envolvidos em processos metabólicos, nutricionais, fisiológicos e imunológicos, gerando um efeito positivo na saúde do hospedeiro, conduzindo ao equilíbrio.(9)

Quando esta homeostase é afetada, surgem consequências para o organismo humano, levando a processos de disbiose, ou seja, patológicos. No entanto, ainda existe dificuldade em perceber se são as mudanças no hospedeiro que provocam a disbiose ou se pelo contrário é a disbiose que vai provocar a mudança do estado homeostático do hospedeiro.(24)

A modulação da microbiota intestinal pode ser usada para tratar e prevenir uma série de patologias. Uma das formas existentes de modular a microbiota, é com a utilização de probióticos, sendo a sua eficácia dependente da etiologia da doença e da estirpe probiótica utilizada.

De acordo com a última definição aceite de probióticos, estes são microrganismos viáveis que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro.(28)

Segundo diversos estudos, a escolha das estirpes probióticas deve basear-se nos seguintes critérios: o género ao qual pertence a bactéria deve ser de origem humana; deve ser estável nas condições fisiológicas, como por exemplo, resistir ao pH ácido do estômago e aos ácidos biliares no intestino; deve ser capaz de aderir ao epitélio intestinal e colonizá-lo; deve ser capaz de produzir compostos antibacterianos; ser metabolicamente

ativo no intestino; não apresentar patogenicidade e não deve possuir genes de resistência a antibióticos.(31)

Diversos ensaios clínicos foram realizados para avaliar os efeitos dos probióticos na prevenção e no tratamento de doenças gastrointestinais, no entanto, são necessários mais estudos para determinar as eficácias, doses efetivas, durações de ação e mecanismos de influência das diferentes estirpes de probióticos. Atualmente, existem evidências suficientes sobre os efeitos dos probióticos no tratamento da diarreia infecciosa e da diarreia associada a antibióticos, existindo também relatos de efeitos benéficos no tratamento da DII, SII, nas infeções urogenitais, na dermatite atópica, em infeções do trato respiratório superior e também na infeção por *Helicobacter pylori*. No entanto, não é possível tirar conclusões definitivas sobre a eficácia e segurança dos probióticos nestas situações, devido às amostras relativamente pequenas que são usadas nos estudos, às limitações dos métodos utilizados nos mesmos e às diferentes estirpes de bactérias probióticas.(52)

Quando um microrganismo é utilizado na formulação de suplementos alimentares ou outros produtos para consumo humano, a sua caracterização completa, tanto a nível genómico como fisiológico, é crucial. Cada microrganismo constituinte de um produto probiótico deve ser identificado ao nível da espécie e estirpe, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura e o seu genoma microbiano deve ser completamente sequenciado. Isto permite a identificação de cada gene envolvido no metabolismo bacteriano e sua função.(37)

Os géneros de bactérias mais utilizados como probióticos são os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e também outras bactérias ácido-láctico, principalmente isolados de produtos lácteos fermentados e do microbioma fecal. No entanto, à medida que o conhecimento acerca do microbioma humano e suas funções aumenta, existem cada vez mais abordagens de novos potenciais probióticos.(95)

A existência de estudos que visam outras formas de modular a microbiota também foi apresentada, como é o caso dos pós-bióticos e paraprobióticos, que surgiram da observação de que os efeitos benéficos da microbiota são mediados pela secreção de vários metabolitos.(1)

Foi evidenciado que os pós-bióticos apresentam vantagens relativamente aos probióticos, no que diz respeito à tecnologia de produção, onde por exemplo, o problema

da padronização de dose não se aplica e também no campo da segurança, os pós-bióticos conseguem contornar o problema da transferência de genes de resistência a antibióticos.(1)

Os avanços constantes na biotecnologia e bioinformática, fornecerão percepções mecanísticas detalhadas sobre a ação de probióticos, bem como indicações para identificar potenciais novos organismos e substratos benéficos para a saúde do hospedeiro. As técnicas utilizadas continuarão a aperfeiçoar-se, sempre com o objectivo de aumentar a confiança e a reprodutibilidade dos resultados dos estudos. Simultaneamente com grandes intervenções e estudos populacionais, o caminho será descobrir maneiras de melhorar a relevância dietética e a eficácia clínica dos probióticos, bem como direccionar essas intervenções e adaptá-las à biologia e microbioma humano.(95)

10. Referências Bibliográficas

1. Marzec A, Feleszko W. Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics 2 . 2020;1–17.
2. Kho ZY, Lal SK. The human gut microbiome - A potential controller of wellness and disease. Vol. 9, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
3. Ahern PP, Maloy KJ. Understanding immune–microbiota interactions in the intestine. *Immunology*. 2020;159(1):4–14.
4. Holmes A, Finger C, Morales-Scheihing D, Lee J, McCullough LD. Gut dysbiosis and age-related neurological diseases; an innovative approach for therapeutic interventions. Vol. 226, *Translational Research*. Mosby Inc.; 2020. p. 39–56.
5. Pradhan D, Mallappa RH, Grover S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. *Food Control* [Internet]. 2020;108(March 2019):106872. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106872>
6. Mizock BA. Probiotics. *Disease-a-Month*. 2015;61(7):259–90.
7. Astashkina AP, Khudyakova LI, Kolbysheva YV. Microbiological Quality Control of Probiotic Products. *Procedia Chem*. 2014;10:74–9.
8. Sarowska J, Jama-kmiecik A. The Therapeutic Effect of Probiotic Bacteria. *Adv Clin Exp Med*. 2013;22(5):759–66.
9. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, De Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. Vol. 6, *Genes and Nutrition*. 2011. p. 209–40.
10. Linares DM, Ross P, Stanton C. Beneficial Microbes: The pharmacy in the gut. Vol. 7, *Bioengineered*. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 11–20.
11. Sekirov I, Russell SL, Caetano L, Antunes M, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. 2010; Available from: www.prv.org
12. Rajilić-Stojanović M. Function of the microbiota. Vol. 27, *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. Bailliere Tindall Ltd; 2013. p. 5–16.
13. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*. 2016 Feb 1;65(2):330–9.
14. Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. Vol. 69, *Pharmacological Research*. 2013. p. 75–86.
15. Vemuri R, Gundamaraju R, Shastri MD, Shukla SD, Kalpurath K, Ball M, et al. Gut Microbial Changes, Interactions, and Their Implications on Human Lifecycle: An Ageing Perspective. Vol. 2018, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2018.
16. Nagpal R, Mainali R, Ahmadi S, Wang S, Singh R, Kavanagh K, et al. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. Vol. 4, *Nutrition and Healthy Aging*. IOS Press; 2018. p. 267–85.

17. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? Vol. 2, *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012. p. 104.
18. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. Vol. 69, *Pharmacological Research*. 2013. p. 52–60.
19. Cani PD. Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. Vol. 67, *Gut*. BMJ Publishing Group; 2018. p. 1716–25.
20. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. Vol. 5, *Tissue Barriers*. Taylor and Francis Inc.; 2017.
21. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. Vol. 157, *Cell*. Elsevier B.V.; 2014. p. 121–41.
22. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. Vol. 30, *Cell Research*. Springer Nature; 2020. p. 492–506.
23. Appanna VD. Dysbiosis, Probiotics, and Prebiotics: In Diseases and Health. In: *Human Microbes - The Power Within*. Springer Singapore; 2018. p. 81–122.
24. Weiss GA, Hennet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. Vol. 74, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2017. p. 2959–77.
25. Ubeda C, Pamer EG. Antibiotics, microbiota, and immune defense. Vol. 33, *Trends in Immunology*. 2012. p. 459–66.
26. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Heal Dis*. 2015 Feb 2;26(0).
27. Hufnagl K, Pali-Schöll I, Roth-Walter F, Jensen-Jarolim E. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. Vol. 42, *Seminars in Immunopathology*. Springer; 2020. p. 75–93.
28. Britton RA, Hoffmann DE, Khoruts A. Probiotics and the Microbiome—How Can We Help Patients Make Sense of Probiotics? *Gastroenterology* [Internet]. 2021;160(2):614–23. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.11.047>
29. Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics History. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50(December):S116–9.
30. Paper FAOF. Probiotics in food FOOD AND NUTRITION. *FAO Food Nutr Pap*. 202AD;
31. Stürmer E, Casasola S, Gall M, Gall M. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. *Rev Bras Nutr Clin* [Internet]. 2012 [cited 2021 Mar 15];27(4):264–72. Available from: <http://www.braspen.com.br/home/wp-content/uploads/2016/12/artigo-8-4-2014.pdf>
32. Paquistão AGK, Israel RE, Áustria AG, Canadá AT, França JK, Irlanda FS, et al. *Probióticos e prebióticos*. 2011;
33. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. *Expert*

- consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506–14.
34. Santos TT VM. A IMPORTÂNCIA DE PROBIÓTICOS PARA O CONTROLE E/OU REESTRUTURAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL. *Rev Científica do Itpac [Internet]*. 2011;4:4–15. Available from: <http://www.itpac.br/arquivos/Revista/42/3.pdf>
 35. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang MLK. Probiotic use in clinical practice: What are the risks? *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6):1256–64.
 36. Foligné B, Daniel C, Pot B. Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(3):284–92.
 37. Toscano M, De Grandi R, Pastorelli L, Vecchi M, Drago L. A consumer's guide for probiotics: 10 golden rules for a correct use. *Dig Liver Dis [Internet]*. 2017;49(11):1177–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2017.07.011>
 38. Cremon C, Barbaro MR, Ventura M, Barbara G. Pre- and probiotic overview. *Curr Opin Pharmacol [Internet]*. 2018;43:87–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.010>
 39. de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Magalhães Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. Vol. 36, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2018. p. 2060–76.
 40. Sharma M, Wasan A, Sharma RK. Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*. *Food Biosci [Internet]*. 2021;41(March):100993. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100993>
 41. Stürmer ES, Casasola S, Gall MC, Gall MC. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. *Rev Bras Nutr Clin*. 2012;27(4):264–70.
 42. Tsai YL, Lin TL, Chang CJ, Wu TR, Lai WF, Lu CC, et al. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):1–8.
 43. Patel R, Dupont HL. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin Infect Dis*. 2015;60(Suppl 2):S108–21.
 44. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(2):300–10.
 45. Bron PA, Kleerebezem M, Brummer RJ, Cani PD, Mercenier A, MacDonald TT, et al. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br J Nutr*. 2017;117(1):93–107.
 46. Liu Y, Tran DQ, Rhoads JM. Probiotics in Disease Prevention and Treatment. *J Clin Pharmacol*. 2018;58(Suppl 10):S164–79.
 47. Yan F, Liu L, Cao H, Moore DJ, Washington MK, Jr RMP, et al. Neonatal Colonization of Mice with LGG Promotes Intestinal Mucosal Immunol Mucosal Immunol. *Mucosal Immunol*. 2017;10(1):117–27.

48. Azad MAK, Sarker M, Wan D. Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res Int.* 2018;2018.
49. Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J Immunol Res.* 2017;2017.
50. Chowdhury AH, Cámara M, Verma C, Eremin O, Kulkarni AD, Lobo DN. Modulation of regulatory and dendritic cell phenotypes following ingestion of *Bifidobacterium longum*, AHCC® and azithromycin in healthy individuals. *Nutrients.* 2019;11(10).
51. Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, et al. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):1–15.
52. Rostami FM, Mousavi H, Mousavi MRN, Shahsafi M. Efficacy of Probiotics in Prevention and Treatment of Infectious Diseases. *Clin Microbiol News* [Internet]. 2018;40(12):97–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2018.06.001>
53. Rahmani P, Moradzadeh A, Farahmand F. Giving probiotics to your children for gastrointestinal problems: In the light of scientific findings. *PharmaNutrition.* 2019;10(July).
54. Isolauri E. The role of probiotics in paediatrics. *Curr Paediatr.* 2004;14(2):104–9.
55. Yan T, Goldman RD. Probiotics for antibiotic-associated diarrhea in children. *2020;66:2015–7.*
56. Mekonnen SA, Merenstein D, Fraser CM, Marco ML. Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2020;61:226–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.01.005>
57. Guo Q, Jz G, Humphrey C, R ED, Bc J, Guo Q, et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea (Review). 2019;
58. Hojsak I. Probiotics in children: What is the evidence? *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2017;20(3):139–46.
59. Leung AKC, Leung AAM, Wong AHC, Hon KL. Travelers' Diarrhea: A Clinical Review. 2019;38–48.
60. Leder K, America L. Advising travellers about management of travellers' diarrhoea. 2015;44(1):34–7.
61. Giddings SL, Stevens AM, Leung DT, City SL, City SL. Travelers' Diarrhea. 2017;100(2):317–30.
62. Bustamante M, Oomah BD, Oliveira WP, Burgos-Díaz C, Rubilar M, Shene C. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia Microbiol (Praha).* 2020;65(2):245–64.
63. Wang Y, Li X, Ge T, Xiao Y, Liao Y, Zhang Y, et al. Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children. 2016;0(July).
64. Bourdillon AT, Edwards HA. Review of probiotic use in otolaryngology. *Am J*

- Otolaryngol - Head Neck Med Surg [Internet]. 2021;42(2):102883. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2020.102883>
65. Strain TP, Nivia C, Mart V, Arroyo R, Mario L, Carrera M, et al. Prevention of Recurrent Acute Otitis Media in Children Through the Use of *Lactobacillus salivarius*. 2019;1–16.
 66. Review AS. A Systematic Review and Meta-analysis of Probiotics for the Treatment of Allergic Rhinitis. 2016;5(6):524–32.
 67. Trial C. Effect of Probiotics on Allergic Rhinitis: A Randomized, Controlled, Clinical Trial. 2020;
 68. Lue K, Sun H, Lu K, Ku M, Sheu J, Chan C, et al. A trial of adding *Lactobacillus johnsonii* EM1 to levocetirizine for treatment of perennial allergic rhinitis in children aged 7 – 12 years. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* [Internet]. 2012;76(7):994–1001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2012.03.018>
 69. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. :657–66.
 70. Article O. Antimicrobial Efficacy of Probiotic and Herbal Oral Rinses against *Candida albicans* in Children : A Randomized Clinical Trial. 2016;9(11):25–30.
 71. Cheng B, Zeng X, Liu S, Zou J, Wang Y. The efficacy of probiotics in management of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78281-7>
 72. Rossoni RD, Velloso M dos S, de Barros PP, de Alvarenga JA, Santos JD dos, Santos Prado ACC dos, et al. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microb Pathog* [Internet]. 2018;123(April):361–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.032>
 73. Hojsak I, Szajewska H, Canani RB, Guarino A, Indrio F, Kolacek S, et al. Probiotics for the prevention of nosocomial diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018;66(1):3–9.
 74. Davison JM, Wischmeyer PE. Probiotic and synbiotic therapy in the critically ill: State of the art. *Nutrition* [Internet]. 2019;59:29–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.07.017>
 75. Wischmeyer PE, McDonald D, Knight R. Role of the microbiome, probiotics, and “dysbiosis therapy” in critical illness. *Curr Opin Crit Care*. 2016;22(4):347–53.
 76. Hod K, Ringel Y. Probiotics in functional bowel disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2016;30(1):89–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2016.01.003>
 77. Chang C, Lin H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2016;30(1):3–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.001>

78. Butterworth AD, Thomas AG, Akobeng AK. Probiotics for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;(3).
79. Vinagre RMD, Vinagre IDF, Vilar-e-Silva A, Fecury AA, Martins LC. Helicobacter pylori infection and immune profile of patients with different gastroduodenal diseases. *Arq Gastroenterol.* 2018;55(2):122–7.
80. Pacifico L, Osborn JF, Bonci E, Romaggioli S, Baldini R, Chiesa C. Probiotics for the treatment of Helicobacter pylori infection in children. *World J Gastroenterol.* 2014;20(3):673–83.
81. Sanford J, Gallo R. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Bone* [Internet]. 2013;25(5):1–19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
82. Navarro-lópez V, Núñez-delegido E, Ruzafa-costas B, Sánchez-pellicer P, Agüera-santos J, Navarro-moratalla L. Probiotics in the therapeutic arsenal of dermatologists. *Microorganisms.* 2021;9(7).
83. Pessemier B De, Grine L, Debaere M, Maes A, Paetzold B, Callewaert C. Gut–skin axis: Current knowledge of the interrelationship between microbial dysbiosis and skin conditions. *Microorganisms.* 2021;9(2):1–33.
84. Knackstedt R, Knackstedt T, Gatherwright J. The role of topical probiotics in skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies. *Exp Dermatol.* 2020;29(1):15–21.
85. Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek WK, Park YH. Probiotics and atopic dermatitis: An overview. *Front Microbiol.* 2016;7(APR):1–7.
86. Polak K, Jobbágy A, Muszyński T, Wojciechowska K, Frątczak A, Banvölgyi A, et al. Microbiome modulation as a therapeutic approach in chronic skin diseases. *Biomedicines.* 2021;9(10):1–38.
87. Huang R, Ning H, Shen M, Li J, Zhang J, Chen X. Probiotics for the treatment of atopic dermatitis in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(SEP):1–11.
88. Blanchet-Réthoré S, Bourdès V, Mercenier A, Haddar CH, Verhoeven PO, Andres P. Effect of a lotion containing the heat-treated probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 on *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2017;10:249–57.
89. Sanders ME. How do we know when something called. *Funct Food Rev.* 2009;Vol. 1(No 1):3–12.
90. Doron S, Snyderman DR. Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis.* 2015;60(Suppl 2):S129–34.
91. Zawistowska-Rojek A, Tyski S. Are probiotic really safe for humans? *Polish J Microbiol.* 2018;67(3):251–8.
92. Sotoudegan F, Daniali M, Hassani S, Nikfar S, Abdollahi M. Reappraisal of probiotics' safety in human. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2019;129(April):22–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.032>

93. Pace F, Macchini F, Massimo Castagna V. Safety of probiotics in humans: A dark side revealed? *Dig Liver Dis.* 2020;52(9):981–5.
94. Koirala S, Anal AK. Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims. *Futur Foods.* 2021;3(December 2020):100013.
95. Cunningham M, Azcarate-Peril MA, Barnard A, Benoit V, Grimaldi R, Guyonnet D, et al. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends Microbiol* [Internet]. 2021;29(8):667–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>
96. Cunningham M, Vinderola G, Charalampopoulos D, Lebeer S, Sanders ME, Grimaldi R. Applying probiotics and prebiotics in new delivery formats – is the clinical evidence transferable? *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2021;112:495–506. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.009>
97. He M, Tan CP, Liu Y, Xu YJ. Foodomics: a new perspective on gut probiotics nutrition and health research. *Curr Opin Food Sci* [Internet]. 2021;41:146–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.04.004>
98. Nataraj BH, Ali SA, Behare P V., Yadav H. Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2020;19(1):1–22. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>
99. Zielińska D, Kolożyn-Krajewska D, Laranjo M. Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *Biomed Res Int.* 2018;2018.