

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

# **O papel da disbiose intestinal na Esclerose Múltipla**

Ana Rita Moreira de Castro

**M**

**2020**



# O papel da disbiose intestinal na Esclerose Múltipla

## **Estudante:**

Ana Rita Moreira de Castro

Correio eletrónico: rita.castro.96@gmail.com

Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

## **Orientadora:**

Professora Doutora Ana Alexandra Duarte Martins da Silva

Professora Auxiliar Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar,  
Universidade do Porto

Assistente Hospitalar Graduada de Neurologia – Centro Hospitalar Universitário do  
Porto

## **Coorientador:**

Professor Doutor Paulo Pinho e Costa

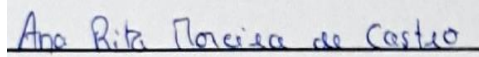
Professor Auxiliar Convidado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar,  
Universidade do Porto

Investigador principal no departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de  
Saúde Doutor Ricardo Jorge

Maio 2020

Porto, 15 de maio de 2020,

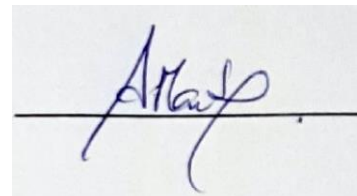
**Estudante:**



Ana Rita Moreira de Castro

(Ana Rita Moreira de Castro)

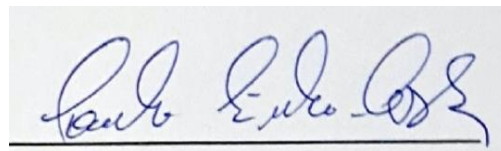
**Orientadora:**



Ana Alexandra Duarte Martins da Silva

(Ana Alexandra Duarte Martins da Silva)

**Coorientador:**



Paulo Pinho e Costa

(Paulo Pinho e Costa)

## Agradecimentos

Termino de maneira algo inesperada o meu longo, mas gratificante, percurso nesta instituição que tanto me acrescentou. No entanto, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que me acompanharam nos últimos meses, naquele que seria um projeto diferente, não fosse o contexto atual de pandemia.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Martins da Silva, um agradecimento especial por ter aceite embarcar nesta aventura comigo, tendo-me desafiado com um projeto inovador e aberto os olhos para a importância da investigação na Medicina. Obrigada, também, por ter estado sempre disponível, independentemente das condições, e me ter orientado pelo melhor caminho.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinho e Costa, obrigada por ter aceite prontamente ser meu coorientador, com toda a paciência que esse papel implica, e me ter aberto as portas do INSA.

A toda a equipa de investigação da UMIB-ICBAS, mas principalmente às investigadoras Marta e Bárbara, e também ao Pedro, investigador no INSA, muito obrigada por toda a hospitalidade e por estarem sempre prontos para me ajudar no que precisasse. À Marta, quero acrescentar um gigante agradecimento, por me ter acompanhado e ajudado todos os dias e em todos os projetos, por ter trabalhado comigo e acreditado em mim e por ter servido de ombro amigo sempre que precisei.

Por fim, quero ainda agradecer ao meu namorado, Vítor Sá, por ter acreditado nas minhas escolhas quando eu própria duvidava delas, bem como à minha família, pelo apoio incondicional, como sempre.

## Resumo

A Esclerose Múltipla é uma doença neurológica crónica cuja etiopatogenia permanece parcialmente desconhecida. Acredita-se que resulte de uma resposta autoimune despoletada pela exposição de indivíduos geneticamente suscetíveis a certos fatores ambientais, alguns deles já bem estabelecidos. Recentemente, o microbioma intestinal, particularmente a sua perturbação (disbiose intestinal) tem surgido na literatura científica como potencial fator envolvido no início e evolução da Esclerose Múltipla. Neste artigo de revisão, compilamos o conhecimento sobre as características do microbioma intestinal de doentes com Esclerose Múltipla e as relações entre o padrão de disbiose intestinal e características clínicas e tratamentos modificadores de doença, com base numa pesquisa alargada na base de dados PubMed de artigos originais publicados entre 2010 e 2020.

A composição global do microbioma intestinal dos doentes com Esclerose Múltipla não difere de indivíduos saudáveis. No entanto identificam-se modificações na abundância relativa de alguns grupos taxonómicos, com tendência para uma maior representação de microrganismos associados a atividade pró-inflamatória e redução de grupos bacterianos com atividade anti-inflamatória. Observam-se, ainda, diferenças no microbioma intestinal entre subgrupos de doentes, categorizados por atividade ou gravidade de doença, havendo dados na literatura a sugerir que o tratamento modificador de doença pode atenuar estas diferenças. Concluimos que os estudos confirmam a presença de disbiose intestinal nos doentes com Esclerose Múltipla, não sendo ainda possível definir um padrão de disbiose característico da doença, nem uma relação de causalidade. O aumento da dimensão das amostras de doentes estudados e a realização de estudos longitudinais são indispensáveis para uma melhor compreensão do papel da disbiose intestinal no aparecimento e evolução da EM.

**Palavras-chave:** Microbiota, Microbioma intestinal, Disbiose, Esclerose Múltipla

## Abstract

Multiple sclerosis is a chronic neurological disease whose etiopathogenesis remains partially unknown. It is believed to result from an autoimmune response triggered by the exposure of genetically susceptible individuals to certain environmental risk factors, some of which already well established. Recently, the gut microbiome, particularly its disturbance (gut dysbiosis) has emerged as a potential predisposing factor for the development and progression of Multiple Sclerosis. In this review article we summarize what is currently known about the composition of the gut microbiome in Multiple Sclerosis patients and the relationships between gut dysbiosis and the different stages and courses of the disease and disease modifying therapies, based on an extensive research in the PubMed database of original articles published between 2010 and 2020.

The global composition of the gut microbiome of Multiple Sclerosis patients does not differ from healthy individuals. However, there are modifications in the relative abundance of some taxonomic groups, with a tendency for greater representation of microorganisms associated with pro-inflammatory activity and reduction of certain anti-inflammatory bacteria. Moreover, we recognise differences in the gut microbiome between subgroups of patients, categorized by disease activity and severity, and there are data suggesting that disease-modifying therapies can mitigate these differences. We conclude that studies confirm the presence of gut dysbiosis in Multiple Sclerosis patients, although it is not yet possible to define a pattern of dysbiosis characteristic of the disease, or a causal relationship. The increase in sample size and the design of longitudinal studies are of greatest importance for the better understanding of the role of gut dysbiosis in Multiple Sclerosis development and progression.

**Key-words:** Microbiota, Gut Microbiome, Dysbiosis, Multiple Sclerosis

## Lista de Abreviaturas

AG	Acetato de Glatirâmero
ARMSS	<i>Age-related Multiple Sclerosis Severity</i>
DMF	Fumarato de Dimetilo
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
EM	Esclerose Múltipla
EMB	Esclerose Múltipla Benigna
EMPP	Esclerose Múltipla Primária Progressiva
EMSP	Esclerose Múltipla Secundária Progressiva
EMSR	Esclerose Múltipla Surto-Remissão
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
HLA	Antigénio Leucocitário Humano
IFN $\gamma$	Interferão Gama
IFN $\beta$	Interferão Beta
IL-10	Interleucina-10
IMD	Imunomodulador
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógenes
NF-KB	Fator Nuclear Kapa B
NFKBIA	Fator Nuclear Kapa B Inibidor Alfa
PPAR $\gamma$	Recetor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma tipo Gama
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossomal
SCI	Síndrome Clínico Isolado
SNC	Sistema Nervoso Central
T <sub>H</sub>	<i>T helper</i>
TMD	Tratamento Modificador de Doença
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tr	T regulador
TRAF	Fator Associado ao Recetor do Fator de Necrose Tumoral

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract .....	iii
Lista de Abreviaturas.....	iv
Lista de Tabelas .....	vi
Lista de Figuras.....	vi
Introdução.....	1
Objetivos .....	2
Metodologia.....	2
Caracterização do Microbioma Intestinal na Esclerose Múltipla.....	3
Diversidade do microbioma intestinal .....	3
Análise do microbioma intestinal por <i>taxa</i> .....	3
Filo .....	3
Género e Espécie.....	4
Microbioma intestinal e fenótipo de Esclerose Múltipla.....	5
Microbioma intestinal e resposta imunológica.....	6
Microrganismos sub-representados na EM .....	7
Microrganismos sobre-representados na EM.....	8
Influência do tratamento no microbioma intestinal.....	9
Conclusão .....	9
Recomendações para o futuro .....	11
Bibliografia .....	18



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Resumo dos artigos incluídos na revisão ordenados por ano de publicação.....	13
<b>Tabela 2.</b> Estudos que demonstram diferenças na composição do microbioma intestinal entre doentes com EM e grupo controlo ao nível de género (e espécie, quando identificada), estratificadas por filo.....	15
<b>Tabela 3.</b> Estudos que demonstram diferenças na composição do microbioma intestinal entre subgrupos de doentes com EM categorizados por atividade e gravidade de doença .....	16
<b>Tabela 4.</b> Estudos que demonstram diferenças na composição do microbioma intestinal com o tratamento modificador de doença.....	17

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Processo de seleção dos artigos incluídos na presente revisão bibliográfica.....	12
---	----

## Introdução

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neurológica crónica, de natureza autoimune, que afeta aproximadamente 2,2 milhões de pessoas pelo mundo<sup>1</sup>, caracterizada por inflamação crónica e processos neurodegenerativos do Sistema Nervoso Central (SNC).<sup>2</sup> Para além de clinicamente heterogénea<sup>3</sup>, é uma doença complexa, de etiopatogénese ainda desconhecida mas que se pensa ser mediada por células T autorreativas<sup>4</sup>, particularmente linfócitos T *helper* 17 (T<sub>H</sub>17) e T *helper* 1 (T<sub>H</sub>1), também com algum papel de linfócitos B<sup>2,5</sup>, sendo esta desregulação desencadeada por interações entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais.<sup>2,4-8</sup> Vários fatores ambientais foram estudados como possíveis desencadeadores da doença num indivíduo geneticamente suscetível, caso dos doentes com haplótipo HLA DRB15:01.<sup>5,8</sup> Por exemplo, níveis baixos de Vitamina D, particularmente em idades precoces<sup>7</sup>, infeção por vírus *Epstein-Barr*, tabagismo e obesidade na adolescência são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de EM.<sup>5-7</sup> Recentemente, o microbioma intestinal foi apontado como outro fator ambiental de suscetibilidade para EM.<sup>5,6,8</sup>

Nos humanos, o trato gastrointestinal é colonizado por uma comunidade composta por triliões de microrganismos (predominantemente bactérias<sup>9</sup>, mas também constituído por vírus, protozoários, fungos e *Archaea*)<sup>10</sup> - o microbiota intestinal.<sup>9,11</sup> Num indivíduo adulto saudável, o microbioma intestinal é relativamente estável e dominado pelos filos bacterianos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, com menor contribuição de *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*.<sup>12</sup> O reportório genético do microbiota intestinal (microbioma intestinal) é cento e cinquenta vezes mais numeroso que o genoma humano e desempenha funções essenciais à homeostasia do organismo humano, influenciando múltiplas vias fisiológicas.<sup>9,11</sup> Esta interação microbioma-hospedeiro é bidirecional, pelo que não só o microbioma influencia a saúde humana, como o ambiente do hospedeiro pode modificar a composição do microbioma.<sup>11</sup> A comunicação entre o microbioma intestinal e o SNC parece ser particularmente relevante, tendo o termo “eixo intestino-cérebro” surgido na literatura devido aos avanços no estudo dos mecanismos fisiopatológicos que explicam a capacidade do microbioma intestinal de modular o desenvolvimento e homeostasia do SNC e, por sua vez, a capacidade do ambiente do SNC interferir com a constituição do microbioma intestinal.<sup>9,10,13</sup>

Tendo em conta a sua relevância para a saúde, tem-se vindo a estudar o papel da perturbação desse ecossistema (disbiose intestinal) como possível desencadeador de doença. Existem estudos que suportam o papel da disbiose intestinal em diferentes patologias, como na Doença Inflamatória Intestinal, Obesidade, Diabetes *Mellitus*, Asma e Artrite Reumatóide.<sup>9,11</sup>

Recentemente, surgiu também alguma evidência do papel do microbioma intestinal em doenças neurodegenerativas, como Parkinson<sup>11</sup> e Alzheimer, e doenças neurológicas imunomediadas, como a EM.<sup>9</sup>

O possível papel do microbioma intestinal na patofisiologia da EM, e de outras doenças imunomediadas, tem como base estudos realizados no modelo animal de EM, Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)<sup>9</sup>, nos quais se verificou uma maior resistência à indução de EAE em animais desprovidos de colonização intestinal, reversível pela transferência de microbioma comensal.<sup>14,15</sup> Recentemente têm-se publicado estudos que evidenciam diferenças na composição do microbioma intestinal em doentes com EM comparativamente a controlos saudáveis e descrevem possíveis relações entre disbiose intestinal e a patofisiologia da doença.

## Objetivos

A presente revisão bibliográfica tem como objetivo descrever o conhecimento atual sobre as características do microbioma intestinal de doentes com EM, particularmente o que o diferencia do microbioma intestinal de indivíduos saudáveis. Pretendemos, ainda, compilar a informação existente sobre as relações entre o padrão de disbiose intestinal e diferentes fases ou cursos de doença, bem como os efeitos dos diferentes tratamentos modificadores de doença no microbioma intestinal. Por último, discutimos os mecanismos que poderão explicar o papel da disbiose intestinal na etiopatofisiologia da EM.

## Metodologia

Procedeu-se a uma pesquisa alargada na base de dados PubMed através da conjugação dos termos “*dysbiosis*”, “*gut dysbiosis*”, “*intestinal dysbiosis*”, “*intestinal microbiome*”, “*gut microbiome*”, “*gut microbiota*”, “*intestinal microbiota*” AND “*multiple sclerosis*”. Foram considerados como critérios de inclusão artigos originais que comparam o microbioma intestinal de doentes com EM e a população saudável ou entre subgrupos de doentes com EM (divididos por subtipo de doença ou regime de tratamento) publicados entre 2010 e 2020, e de exclusão artigos escritos num idioma que não seja Português, Inglês ou Espanhol, publicações referentes a microbioma não intestinal e não procariota (bacteriano e *Archaea*), revisões bibliográficas, revisões sistemáticas e meta-análises. Após uma triagem inicial com base na leitura do título e *abstract* e exclusão de publicações repetidas, selecionamos vinte e um artigos, três dos quais foram posteriormente excluídos, após leitura integral do artigo, por não cumprirem os critérios de inclusão pré-definidos. Foram também analisadas as referências dos artigos e incluída bibliografia

aí encontrada que cumprisse os critérios de inclusão estabelecidos. Este processo encontra-se esquematizado na Fig. 1.

## Caracterização do Microbioma Intestinal na Esclerose Múltipla

Nos estudos incluídos nesta revisão (Tabela 1) o microbioma intestinal luminal (obtido por amostras fecais) ou da superfície mucosa (obtido por biópsia intestinal) foi caracterizado utilizando técnicas de sequenciação de nova geração das regiões hipervariáveis do gene RNA ribossomal (rRNA) 16S, com apenas exceção de um<sup>16</sup>, no qual o microbioma intestinal foi caracterizado através da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

De facto, o marcador filogenético mais frequentemente utilizado na sequenciação de genoma bacteriano e de *Archaea* é o RNA ribossomal 16S<sup>9</sup>, um locus ubiqüitário constituído por regiões lentamente evolutivas e, portanto, altamente conservadas entre procaríotas, intercaladas por nove regiões rapidamente evolutivas (hipervariáveis) específicas de cada espécie, designadas V1-V9, que permitem a identificação de *taxa* individuais.<sup>9,17,18</sup>

## Diversidade do microbioma intestinal

A análise do microbioma intestinal inicia-se invariavelmente pela avaliação da diversidade das amostras. A diversidade alfa é uma medida da complexidade ecológica dentro de uma amostra, traduzindo a riqueza, ou seja, o número de diferentes espécies em cada amostra, e a uniformidade com que estas se distribuem. A diversidade beta avalia a variabilidade da composição microbiana entre amostras.<sup>19</sup>

Quando comparada a composição global do microbioma intestinal, entre doentes com Esclerose Múltipla e controlos saudáveis, não se identificaram diferenças estatisticamente significativas em termos de diversidade alfa<sup>20-33</sup> entre as duas populações, nem de diversidade beta<sup>21-23,25-28</sup> na maioria dos estudos. As diferenças em termos de microbioma intestinal tornam-se mais evidentes quando analisadas ao nível dos diferentes *taxa* (filo, género e espécie).<sup>20-23,26,28,29,31,32</sup>

## Análise do microbioma intestinal por *taxa*

### Filo

Estudos que compararam populações de doentes com EM e indivíduos saudáveis, constataram que o microbioma intestinal é composto predominantemente por bactérias dos filós *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, com contribuição menor de *Actinobacteria* e *Proteobacteria* em ambos

os grupos. Jangi *et al.*<sup>22</sup> identifica também uma pequena parcela de *Verrucomicrobia* em ambas as populações.

Três artigos<sup>20,24,28</sup> descrevem uma abundância relativa de *Actinobacteria* superior nos doentes com EM comparativamente com controlos (apesar de Miyake *et al.*<sup>20</sup> não atingir a significância estatística). Os restantes achados são menos consistentes entre autores. Por exemplo, Tremlett *et al.*<sup>24</sup> identifica *Synergistetes* e *Lentisphaerae* como dois filios exclusivos de doentes pediátricos com EM curso surto-remissão (EMSR), enquanto Castillo-Álvarez *et al.*<sup>28</sup> refere que, na sua população de doentes adultos, a abundância relativa de *Lentisphaerae* era inferior à dos controlos.

Apesar da quase totalidade do microbioma intestinal ser bacteriano, Castillo-Álvarez *et al.*<sup>28</sup> e Jangi *et al.*<sup>22</sup> reconhecem também uma pequena contribuição do filo *Euryarchaeota* (do domínio *Archaea*). No entanto, estes contrariam-se: para Jangi *et al.*<sup>22</sup> os doentes com EM têm uma abundância relativa superior de *Euryarchaeota* relativamente à população saudável enquanto Castillo-Álvarez *et al.*<sup>28</sup> descreve este filo como diminuído na sua população de doentes.

## Género e Espécie

Os resultados da investigação em termos de género e espécie são diversos e, por vezes, até discordantes (Tabela 2). Na presente revisão, destacamos os achados mais consistentes.

Dentro do filo *Firmicutes*, observa-se uma menor prevalência de *Faecalibacterium*<sup>20,21,32</sup>, *Eubacterium*<sup>20,28</sup> e *Roseburia*<sup>20,31</sup> e maior abundância relativa de *Ruminococcus*<sup>21,28,31</sup>, *Streptococcus*<sup>20,29</sup> e *Blautia*<sup>23,28</sup> no microbioma intestinal de doentes com EM comparativamente com controlos saudáveis. Existe um estudo de Castillo-Álvarez *et al.*<sup>28</sup> que encontrou uma maior abundância de *Faecalibacterium*<sup>20,21,32</sup> nos doentes com EM.

Do filo *Bacteroidetes*, os doentes com EM apresentam um decréscimo de *Prevotella*<sup>20,26,28,29</sup> (Miyake *et al.*<sup>20</sup> e Castillo-Álvarez *et al.*<sup>28</sup> concordam inclusive ao nível de espécie – *Prevotella copri*), *Bacteroides*<sup>20,24,28</sup> e *Parabacteroides*<sup>23,26</sup> e enriquecimento em *Alistipes*<sup>28,31</sup> relativamente à população saudável. O estudo de Reynders *et al.*<sup>31</sup> documenta elevação de *Parabacteroides* nos doentes com EM. No entanto, o próprio autor conclui que esta discrepância se pode dever à diferente constituição da sua população, que inclui doentes com outros cursos clínicos de doença para além de EMSR.

Quanto a *Actinobacteria*, os estudos reportam uma maior abundância relativa de *Bifidobacterium* nos doentes com EM do que no grupo controlo<sup>20,24,26,28</sup>. Já no filo *Proteobacteria*, os achados são bastante díspares, não havendo concordância entre autores.

Jangi *et al.*<sup>22</sup> e Cekanaviciute *et al.*<sup>26</sup> fazem ainda referência a uma maior prevalência de *Akkermansia* (*Akkermansia muciphila*), do filo *Verrucomicrobia*, nos seus doentes com EMSR.

Relativamente ao filo *Euryarchaeota*, do domínio *Archaea*, identifica-se apenas *Methanobrevibacter*, considerado por Jangi *et al.*<sup>22</sup> e Reynders *et al.*<sup>31</sup> como sendo mais prevalente nos doentes com EM comparativamente com controlos saudáveis, contrariamente aos achados de Castillo-Álvarez *et al.*<sup>28</sup>.

Swidzinski *et al.*<sup>16</sup> opta por uma abordagem diferente, procedendo a uma avaliação quantitativa de caracterização de microbioma intestinal de doentes com EMSR por FISH. O achado mais significativo foi a menor concentração do subgrupo de bactérias aos quais denominou “bactérias essenciais” (*Roseburia*, *Bacteroides* e *Faecalibacterium prausnitzii*) no microbioma de doentes com EM relativamente à população saudável. Estas bactérias foram assim denominadas por estarem sempre presentes e contribuírem para cerca de metade da composição do microbioma em indivíduos saudáveis.

Tratando-se de estudos observacionais caso-controlo, estes achados são meramente descritivos, não se conseguindo estabelecer uma relação causa-efeito entre disbiose intestinal e EM. No entanto, quando o microbioma intestinal de doentes com EM e controlos é transplantado para modelos animais, documenta-se um aumento significativo na incidência espontânea de EAE nos ratos colonizados com microbioma intestinal de dadores com EMSR comparativamente com aqueles colonizados com microbioma intestinal de controlos saudáveis.<sup>26,27</sup> A maior incidência de EAE parece acompanhar-se de uma deficiência na indução de células T reguladoras produtoras de IL-10.<sup>26,27</sup> Parece, assim, começar a surgir evidência que favorece o papel da disbiose intestinal como causa, em vez de consequência, de EM.

## Microbioma intestinal e fenótipo de Esclerose Múltipla

Para além das diferenças encontradas no microbioma intestinal de grupos de doentes com EM relativamente ao microbioma da população saudável, identificam-se variações no microbioma intestinal entre subgrupos de doentes, quando categorizados por atividade ou gravidade de doença (Tabela 3). Estas diferenças observam-se logo ao nível da composição global das amostras, em termos de diversidade alfa, encontrando-se uma tendência para menor riqueza de espécies em doentes com maior atividade de doença.<sup>23</sup> Reynders *et al.*<sup>31</sup> que divide a sua população de doentes com EM (n=120) em cinco subtipos consoante o fenótipo (EMSR não tratada, EMSR não tratada e em surto, EMSR não tratada benigna, EMSR tratada com interferão e EM primária progressiva não

ativa) verifica uma menor riqueza de espécies nos subgrupos de doença associados a maior inflamação do SNC, particularmente no subgrupo de doentes com EMSR ativa e sem tratamento.

Quando analisada a diversidade beta, Chen *et al.*<sup>23</sup> encontra também diferenças na composição do microbioma intestinal entre doentes com EMSR ativa e em remissão, sendo a composição do microbioma intestinal dos doentes em remissão mais próxima da do grupo controlo.

Cosorich *et al.*<sup>25</sup> descreve diferenças no microbioma intestinal ao nível de filo, nomeadamente uma maior prevalência de *Firmicutes* e redução de *Bacteroidetes* na EMSR na fase ativa comparativamente com doentes em remissão, mas também de género e espécie, particularmente uma maior representação de *Streptococcus* (predominantemente *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis*) e redução de *Prevotella* nos doentes com EMSR ativa. Refere ainda que a prevalência de *Prevotella* nos doentes com EMSR não ativa era superior não só à dos doentes na fase ativa, mas também relativamente a controlos saudáveis. Estes achados são particularmente relevantes pelo facto da autora ter analisado amostras de microbioma recolhido à superfície da mucosa intestinal, o qual, encontrando-se em maior proximidade com o epitélio, detém um maior potencial de modulação da resposta imunológica comparativamente com os microrganismos presentes no lúmen intestinal, que constituem o grosso das amostras fecais dos participantes.<sup>34</sup>

Numa população de doentes pediátricos com EMSR, Tremlett *et al.*<sup>35</sup> associa a depleção de *Fusobacteria* a um menor tempo até exacerbação, referindo um risco 3 vezes superior de surto precoce nas crianças com esta alteração.

Reynders *et al.*<sup>31</sup> identifica variações na composição do microbioma intestinal entre os fenótipos de doença, particularmente para *Butyricoccus*, *Clostridium IV*, *Clostridium XVIII*, *Gemmiger*, *Parabacteroides*, *Sporobacter* e *Methanobrevibacter*. Descreve ainda que a abundância de *Butyricoccus* é inversamente proporcional ao ARMSS (*Age-related Multiple Sclerosis Severity*) score<sup>36</sup>, uma medida da *Expanded Disability Status Scale* (EDSS)<sup>37</sup> corrigida para a idade.

## Microbioma intestinal e resposta imunológica

A relação entre o microbioma intestinal e padrões de resposta inflamatória em doentes com EM foi investigada em parte dos estudos revistos utilizando, para este propósito, a caracterização das diferentes populações linfocitárias, centrais na patofisiologia da doença.

## Microrganismos sub-representados na EM

A menor abundância de *Prevotella* nas populações de doentes com EM foi encontrada em diversos estudos<sup>20,26,28,29</sup>. Esta depleção correlaciona-se negativamente com a proporção de linfócitos T<sub>H</sub>17 no sangue periférico<sup>29</sup> e com a frequência destes no intestino delgado<sup>25</sup> nos doentes com EM. Segundo Cosorich *et al.*<sup>25</sup> os níveis de linfócitos T<sub>H</sub>17 intestinais estão particularmente elevados na subpopulação de doentes com EMSR ativa, sendo superiores aos encontrados nos doentes com EMSR não ativa e controlos saudáveis, o que, pela sua relação inversa, pode explicar a diminuição de *Prevotella* nos doentes com EMSR ativa nesse mesmo estudo.

A abundância relativa de *Fusobacteria* (identificado por Tremlett *et al.*<sup>35</sup> como associado a maior risco de surto precoce, quando em menor abundância no microbioma intestinal) foi positivamente relacionada com os níveis séricos de células T reguladoras num grupo de controlos pediátricos.<sup>38</sup>

O género *Parabacteroides*, nomeadamente a espécie *P. distasonis* reportada como sub-representada em doentes com EM por Cekanaviviute *et al.*<sup>26</sup>, parece ser capaz de desviar o perfil de linfócitos T periféricos para um fenótipo imunorregulador por estimular a diferenciação de linfócitos T CD25<sup>+</sup>, incluindo linfócitos CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Tr1, quando células mononucleares periféricas são expostas aos seus extratos *in vitro*<sup>26</sup>. Reynders *et al.*<sup>31</sup> regista, contrariamente, um aumento na abundância relativa de *Parabacteroides* na sua população de doentes com EM. No entanto, o autor admite a possibilidade deste achado poder dever-se à inclusão de fenótipos de EM com menor atividade inflamatória.

Portanto, *Prevotella*, *Fusobacteria* e *Parabacteroides distasonis* encontram-se sub-representados no microbioma intestinal dos doentes com EM e foram associados a funções anti-inflamatórias, favorecendo a diferenciação de populações linfocitárias reguladoras em detrimento de populações pró-inflamatórias, especificamente linfócitos T<sub>H</sub>17.

A relação entre a menor abundância de outros microrganismos (*Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Roseburia* e *Bacteroides*) e as populações linfocitárias nos doentes EM não foram investigadas nos estudos revistos. No entanto, estes microrganismos parecem igualmente desempenhar funções anti-inflamatórias quando estudados noutros contextos.<sup>39-43</sup> *Faecalibacterium*, *Eubacterium* e *Roseburia* são bactérias produtoras de butirato pertencentes ao grupo IV e XIVa de *Clostridia*.<sup>39,40</sup> Os dois principais produtores de butirato são *Faecalibacterium prausnitzii* e *Eubacterium rectale*<sup>39,40</sup> (ambos encontrados em menor abundância nos doentes com EM no estudo de Miyak *et al.*<sup>20</sup>). O Butirato é um ácido gordo de cadeia curta resultante da fermentação cólica, envolvido em processos intra e extra-intestinais importantes.<sup>39,40</sup> De entre as suas múltiplas ações, o butirato parece desempenhar um efeito anti-inflamatório por inibição do fator NF- $\kappa$ B, um regulador da resposta imune pró-inflamatória, por sobre-expressão do recetor



nuclear PPAR $\gamma$  nos enterócitos e por inibição da via de sinalização do IFN $\gamma$ .<sup>40</sup> A diminuição de *Faecalibacterium prausnitzii* no microbioma intestinal foi reportada na Doença Inflamatória Intestinal.<sup>41</sup> Do género *Bacteroides*, o *Bacteroides fragilis*, identificado como menos prevalente por Tremlett *et al.*<sup>24</sup> parece desempenhar um papel protetor contra o desenvolvimento de EAE, atrasando o desenvolvimento da mesma e diminuindo a sua severidade.<sup>42</sup> A ação anti-inflamatória do *B. fragilis* é mediada pelo polissacarídeo A que este produz, que favorece a diferenciação de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> produtoras de IL-10 em modelos animais.<sup>42,43</sup>

### Microrganismos sobrerrepresentados na EM

A abundância de *Streptococcus* no microbioma intestinal, mais elevada nos doentes com EM<sup>20,29</sup>, particularmente naqueles com EMSR ativa<sup>25</sup>, correlaciona-se positivamente com os níveis séricos de linfócitos T<sub>H</sub>17 e negativamente com a proporção de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> periféricas em doentes com EM.<sup>29</sup> Para além disso, parece contribuir para a menor capacidade de diferenciação de células T reguladoras *in vitro* identificada nos doentes com EM.<sup>26,29</sup>

O *Acinetobacter calcoaceticus*, descrito como mais abundante no microbioma intestinal de doentes com EM por Cekanaviciute *et al.*<sup>26</sup>, parece associar-se a uma menor proporção de células T reguladoras CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> e maior proporção de linfócitos T<sub>H</sub>1 produtores de IFN $\gamma$  *in vitro*. No mesmo estudo, a *Akkermansia muciphila* estimula, de forma ainda mais acentuada, a diferenciação de linfócitos T<sub>H</sub>1 produtores de IFN $\gamma$ . *Akkermansia muciphila* e *Methanobrevibacter smithii* parecem correlacionar-se positivamente com a expressão dos genes TRAF5 (com ação pró-inflamatória)<sup>44</sup>, MAPK14 e MAPK1 (envolvidos na ativação imune tanto inata como adaptativa)<sup>44</sup> nos linfócitos T e monócitos de doentes com EM e negativamente com a expressão de NFKBIA (gene pró-apoptótico)<sup>44,22</sup>. Estes genes foram já documentados como estando sobre-expressos (TRAF5, MAPKs) e sub-expressos (NFKBIA) na EM.<sup>44</sup>

Assim, *Streptococcus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Akkermansia muciphila* e *Methanobrevibacter smithii*, para além de encontrados em maior abundância no microbioma intestinal dos doentes com EM, parecem desempenhar ações pró-inflamatórias, segundo a bibliografia revista.

O papel de *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Blautia* e *Alistipes* na patofisiologia da EM é escasso. No entanto, *Bifidobacterium* e *Ruminococcus* foram implicados noutros contextos de doença inflamatória.<sup>45-48</sup> O *Bifidobacterium animalis*, por exemplo, parece desempenhar um papel anti-inflamatório e protetor contra EAE.<sup>45,46</sup> No caso de *Bifidobacterium longum*, identificado por Castillo-Álvarez *et al.*<sup>28</sup>, a sua ação parece ser bidirecional e dependente do subtipo, havendo

variantes de *B. longum* promotoras de uma resposta imunorreguladora por indução da produção de IL-10 enquanto outras apresentam um perfil pró-inflamatório mediado por IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ .<sup>47</sup> A maior abundância de *Ruminococcus* no microbioma intestinal não é exclusivo de EM, identificando-se também noutras doenças inflamatórias, como a Doença de Crohn, na qual *Ruminococcus gnavum*, especificamente, produz um polissacárido que induz a produção de TNF $\alpha$  pelas células dendríticas<sup>48</sup>.

## Influência do tratamento no microbioma intestinal

A influencia dos tratamentos imunomoduladores e imunossuppressores no microbioma dos doentes com EM foi investigada em diversos estudos<sup>21,22,24,25,27,28,32,49</sup> (Tabela 4). Os resultados encontrados mostram que os doentes tratados têm uma composição do microbioma intestinal mais próxima dos controlos saudáveis<sup>21,22,24,25,27,28,32,49</sup>. Por exemplo, Jangi *et al.*<sup>22</sup> descreve uma maior prevalência de *Prevotella* na sua subpopulação de doentes tratados com Interferão  $\beta$  (IFN $\beta$ ) e Acetato de Glatirâmero, comparativamente com a subpopulação não tratada, e Cosorich *et al.*<sup>25</sup> encontra a mesma alteração especificamente nos doentes tratados com IFN $\beta$ . Storm-Larsen *et al.*<sup>32</sup> observa também um aumento progressivo da abundância de *Faecalibacterium* no microbioma intestinal de doentes com EM durante um curso de 12 semanas de tratamento com Fumarato de Dimetilo. A influência dos imunomoduladores no microbioma intestinal parece verificar-se mesmo ao nível de filo.<sup>24,28,32,49</sup>

Para além do tratamento imunomodulador, o perfil do microbioma intestinal de doentes com EM parece também modificar-se no sentido anti-inflamatório ou seja assemelhar-se ao de controlos saudáveis após suplementação com probióticos<sup>50</sup>, vitamina D<sup>21</sup> e com a própria dieta (dieta cetogénica<sup>16</sup>, dieta rica em vegetais/pobre em proteína<sup>51</sup> e jejum intermitente<sup>52</sup>).

## Conclusão

Existem diferenças na constituição do microbioma intestinal quando comparados doentes com EM e indivíduos saudáveis. Estas não se verificam ao nível da composição global do microbioma intestinal (diversidade alfa e beta) mas sim na abundância relativa de certos grupos taxonómicos, que vão sendo mais evidentes à medida que se avança em termos de *taxa*, no sentido decrescente de classificação hierárquica. Assim, a disbiose intestinal da EM parece resultar de alterações subtis, com ganhos e perdas de determinados grupos bacterianos, com maior variabilidade ao nível de género.

Apesar da documentada disbiose, não se constata um padrão característico da doença, uma vez que os achados são diversos e, por vezes, até discordantes entre autores. Tais discrepâncias podem resultar, por exemplo, da utilização de diferentes técnicas para caracterização do microbioma intestinal e/ou das características das populações incluídas. A maioria dos estudos utiliza a mesma tecnologia de sequenciação de rRNA 16S, mas a escolha das regiões hipervariáveis alvo difere entre autores, o que pode ter implicações ao nível da identificação dos *taxa* individuais, uma vez que as diferentes regiões apresentam diferentes capacidades de discriminação.<sup>18</sup> A contradição pode também justificar-se pela limitação da classificação taxonómica aos níveis acima de género, dado que diferentes espécies e subespécies pertencentes a um mesmo género podem desempenhar funções completamente opostas, como é o exemplo dos *Bifidobacterium*. Por outro lado, sabendo que o microbioma intestinal é também influenciado por fatores ambientais relacionados com o estilo de vida (como hábitos alimentares)<sup>11</sup>, pela localização geográfica<sup>53</sup> e pelo tratamento instituído, é possível que as discrepâncias entre autores se devam a fatores geográficos e culturais, bem como às diferenças na representação dos tratamentos modificadores de doença na população de doentes com EM. Tremlett *et al.*<sup>24,35,38</sup> defende que o estudo de populações pediátricas com EM permite diminuir as exposições ambientais, potencialmente confundidoras, que se vão acumulando ao longo da vida. No entanto, sendo a EM uma doença típica do jovem adulto, com pico de incidência por volta dos 30 anos de idade<sup>4</sup>, a EM em idade pediátrica é pouco frequente (prevalência de 0.69-26.92 por 100 000 crianças)<sup>54</sup>, justificando a pequena amostra incluída.

Quando analisados separadamente os comensais que são mencionados com maior frequência como sobre ou sub-representados no microbioma de doentes com EM, constata-se uma tendência para maior abundância relativa de microrganismos com ação descrita como pró-inflamatória (como *Streptococcus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Akkermansia muciphila*, *Methanobrevibacter smithii*) em detrimento de bactérias com ação predominantemente anti-inflamatória (*Prevotella*, *Fusobacteria*, *Parabacteroides distasonis*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Roseburia* e *Bacteroides fragilis*). Portanto, as modificações no microbioma intestinal de doentes com EM parecem favorecer um ambiente pró-inflamatório, o que apoia a hipótese de um papel da disbiose intestinal na patofisiologia da doença. Porém, sabemos que tal como o microbioma intestinal consegue perturbar a homeostasia do hospedeiro este também pode influenciar a composição do microbioma, pelo que permanece por esclarecer se existe uma relação de causalidade. Os estudos com modelos animais de EM (EAE), que foram a ponte para o estudo do microbioma intestinal como potenciador da doença, poderão servir também como ponto de partida para se estabelecer uma possível relação de causalidade, por já se ter demonstrado que o

microbioma intestinal humano derivado de doentes com EM se associa a maior taxa de indução de EAE espontânea, quando transplantado para modelos animais.

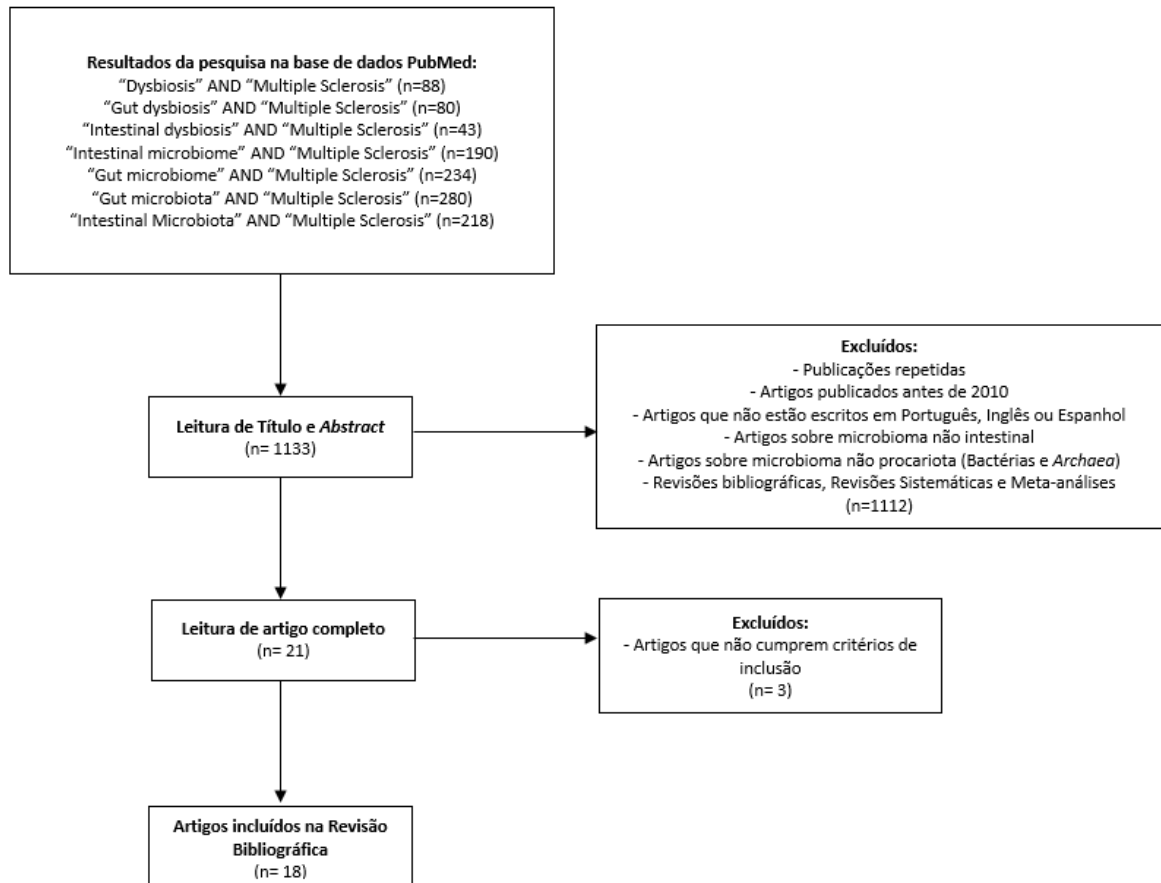
O microbioma intestinal parece não só relacionar-se com a etiopatogenia da EM, mas também com o próprio curso da doença e, no caso de doentes com EMSR, com a atividade de doença, apesar da evidência ser ainda escassa e os subgrupos estudados demasiado pequenos para se conseguir assumir os resultados como significativos. Nos doentes com EMSR identificam-se variações mesmo na diversidade, observando-se menor diversidade alfa nos doentes com maior atividade de doença. Doentes em remissão apresentam um microbioma de características aproximadas às da população saudável.

As diferenças no microbioma intestinal parecem também atenuar-se na população sob tratamento modificador de doença, apesar das alterações do microbioma variarem com o tipo de tratamento implementado, por exemplo, a maior representação de *Prevotella* parece relacionar-se especificamente com o tratamento com IFN $\beta$ . Estes achados sugerem que a modificação do microbioma intestinal pode ser um dos mecanismos que justifica a eficácia destes fármacos no controlo da doença. No entanto, também as subpopulações de doentes, quando divididos por tipo de tratamento instituído, são demasiado pequenas para se poderem inferir conclusões concretas.

Outras medidas não farmacológicas, como a suplementação com vitamina D, probióticos ou, simplesmente, a modificação da dieta, parecem ser igualmente eficazes na manipulação do microbioma, promovendo um ambiente imunorregulador, descobrindo-se outras potenciais ferramentas adjuvantes não só para o tratamento da EM já estabelecida, mas também com um possível papel na prevenção de doença.

## Recomendações para o futuro

O estudo do microbioma intestinal na Esclerose Múltipla é ainda recente. Apesar dos achados serem encorajadores, por favorecerem a existência de disbiose intestinal nos doentes com EM, permanece por estabelecer um padrão de disbiose característico da doença e uma relação de causalidade. Estudos de maior dimensão serão indispensáveis para, no futuro, se conseguir uma melhor caracterização da disbiose na EM e nas suas subpopulações, permitindo inferir conclusões mais seguras relativamente ao papel do microbioma intestinal na atividade da doença e a intervenção dos tratamentos no microbioma intestinal. Estudos longitudinais são também essenciais para perceber se as alterações encontradas se mantêm a longo prazo. Por fim, estudos que relacionem o microbioma intestinal com biomarcadores (moleculares, imagiológicos, etc.) de doença são necessários para uma melhor compreensão do potencial papel do microbioma na patofisiologia da EM.



**Figura 2.** Processo de seleção dos artigos incluídos na presente revisão bibliográfica.

**Tabela 1.** Resumo dos artigos incluídos na revisão ordenados por ano de publicação

<b>Autor (data, local)</b>	<b>Tipo</b>	<b>População</b>	<b>Caracterização microbioma</b>
Miyake <i>et al.</i> <sup>20</sup> (2015, Japão)	Caso-controlo	20 EMSR - 7 sem tratamento - 9 IFN $\beta$ , 4 corticoide 40 controlos	Amostras fecais Sequenciação das regiões V1-V2 do rRNA 16S (Roche 454)
Cantarel <i>et al.</i> <sup>21</sup> (2015, EUA)	Caso controlo e experimental (caracterização do microbioma intestinal após suplementação com vitamina D)	7 EMSR - 2 sem tratamento - 5 AG 8 controlos	Amostras fecais DNA <i>microarray</i> do rRNA 16S (PhyloChip)
Jangi <i>et al.</i> <sup>22</sup> (2016, EUA)	Caso-controlo	60 EMSR - 28 sem tratamento - 18 IFN $\beta$ , 14 AG 43 controlos	Amostras fecais Sequenciação das regiões V3-V5 (Roche 454) e V4 (Illumina MiSeq) do rRNA 16S
Chen <i>et al.</i> <sup>23</sup> (2016, EUA)	Caso-controlo	31 EMSR (12 ativa, 19 remissão) - 11 sem tratamento - 14 IFN $\beta$ , 1 AG, 5 Natalizumab 36 controlos	Amostras fecais Sequenciação das regiões V3-V5 do rRNA 16S
Tremlett <i>et al.</i> <sup>24</sup> (2016, EUA)*	Caso-controlo	18 EMSR - 5 GA, 3 IFN $\beta$ , 1 Natalizumab, 6 corticoide 17 controlos	Amostras fecais Sequenciação da região V4 do rRNA 16S (Illumina MiSeq)
Tremlett <i>et al.</i> <sup>35</sup> (2016, EUA)*	Coorte prospetivo	17 EMSR (7 doença ativa, 10 em remissão) - 5 GA, 3 IFN $\beta$ , 1 Natalizumab, 6 corticoide	Amostras fecais Sequenciação da região V4 do rRNA 16S (Illumina MiSeq)
Tremlett <i>et al.</i> <sup>38</sup> (2016, EUA)*	Caso-controlo	15 EMSR - 7 IMD, 5 corticoide 9 controlos	Amostras fecais Sequenciação da região V4 do rRNA 16S (Illumina MiSeq)
Cosorich <i>et al.</i> <sup>25</sup> (2017, Itália)	Caso controlo	19 EMSR (9 ativa, 10 remissão) - 0 sem tratamento - 7 IFN $\beta$ , 9 AG, 3 Fingolimod 17 controlos	Biópsia de intestino delgado Sequenciação das regiões V3-V5 do rRNA 16S (Roche 454)
Cekanaviciute <i>et al.</i> <sup>26</sup> (2017, EUA)	Caso-controlo	71 EMSR - 71 sem tratamento 71 controlos	Amostras fecais Sequenciação da região V4 do rRNA 16S (Illumina MiSeq)
Berer <i>et al.</i> <sup>27</sup> (2017, Alemanha)	Caso-controlo (pares de gémeos monozigóticos)	34 EM (3 SCI, 22 EMSR, 7 EMSP, 2 EMPP) - 15 sem tratamento - 13 IFN $\beta$ , 4 Natalizumab, 1 AG e 1 Azatioprina 34 controlos	Amostras fecais Sequenciação das regiões V3-V5 do rRNA 16S (Roche 454)
Swidsinski <i>et al.</i> <sup>16</sup> (2017, Alemanha)	Caso-controlo e experimental (caracterização do microbioma intestinal após dieta cetogénica)	25 EMSR 14 controlos	Amostras fecais FISH do RNA ribossomal

Castillo-Álvarez <i>et al.</i> <sup>28</sup> (2018, Espanha)	Caso-controlo	30 EMSR - 15 sem tratamento - 15 IFNβ1b 14 controlos	Amostras fecais Sequenciação da região V4 do rRNA 16S (Illumina MiSeq)
Cekanaviciute <i>et al.</i> <sup>30</sup> (2018, EUA)	Caso-controlo	25 EMSR - 25 sem tratamento 24 controlos	Amostras fecais Sequenciação da região V4 do gene 16S rRNA (Illumina MiSeq)
Zeng <i>et al.</i> <sup>29</sup> (China, 2019)	Caso-controlo	34 EMSR (26 ativos, 8 remissão) - 21 sem tratamento - 5 Azatioprina, 2 Metrotrexato, 21 corticoide, 6 outros 34 Neuromielite ótica 34 controlos	Amostras fecais Sequenciação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA (Illumina MiSeq)
Reynders <i>et al.</i> <sup>31</sup> (2019, Bélgica)	Caso-controlo	98 EM (24 EMSR sem tratamento, 4 EMSR sem tratamento e em surto, 24 EMSR sob IFN, 16 EMPP, 20 EMB) 120 controlos	Amostras fecais Sequenciação da região V4 do rRNA 16S (Illumina MiSeq)
Ventura <i>et al.</i> <sup>33</sup>	Caso-controlo	45 RRMS - 45 sem tratamento 44 controlos	Amostras fecais Sequenciação da região V4 do rRNA 16S (Illumina MiSeq)
Storm-Larsen <i>et al.</i> <sup>32</sup> (2019, Noruega)	Caso-controlo e experimental (caracterização do microbioma intestinal após diferentes regimes de tratamento)	34 EMSR - 25 DMF - 3 AG, 3 Peguinterferão β1a, 3 IFNβ 165 controlos	Amostras fecais de Sequenciação das regiões V3-V4 do rRNA 16S (Illumina MiSeq)
Katz-Sand <i>et al.</i> <sup>49</sup> (2019, EUA)	Coorte retrospectivo	168 EMSR - 75 não tratados - 33 DMF, 60 AG	Amostras fecais Sequenciação da região V4 do rRNA 16S (Illumina MiSeq)

\*: estudos com população pediátrica, AG: acetato de glatirâmero, DMF: Fumarato de Dimetilo, EM: esclerose múltipla, EMB: Esclerose múltipla benigna, EMPP: Esclerose Múltipla Primária Progressiva, EMSP: Esclerose Múltipla Secundária Progressiva, EMSR: Esclerose Múltipla curso surto-remissão, EUA: Estados Unidos da América; FISH: hibridização *in situ* por fluorescência, IFN: interferão, IMD: tratamento imunomodulador, rRNA: ácido ribonucleico ribossomal, SCI: síndrome clínico isolado

**Tabela 2.** Estudos que demonstram diferenças na composição do microbioma intestinal entre doentes com EM e grupo controlo ao nível de género (e espécie, quando identificada), estratificadas por filo.

Autor	Diferenças no microbioma intestinal entre EM e controlos	
	Sobrerrepresentados na EM	Sub-representados na EM
Miyake <i>et al.</i> <sup>20</sup>	(F) <i>Streptococcus</i> ( <i>S. thermophilus</i> ), (A) <i>Bifidobacterium</i> , <i>Eggerthella</i> ( <i>E. lenta</i> )	(F) <i>Anaerostipes</i> ( <i>A. hadrus</i> ), <i>Clostridium</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Eubacterium</i> ( <i>E. rectale</i> ), <i>Faecalibacterium</i> ( <i>F. prausnitzzi</i> ), <i>Lachnospira</i> , <i>Megamonas</i> , <i>Roseburia</i> (B) <i>Bacteroides</i> ( <i>B. stercoris</i> , <i>B. coprocola</i> , <i>B. coprophilus</i> ), <i>Prevotella</i> ( <i>P. copri</i> ) (P) <i>Sutterella</i> ( <i>S. wasworthnsis</i> )
Cantarel <i>et al.</i> <sup>21</sup>	(F) <i>Ruminococcus</i>	(F) <i>Faecalibacterium</i>
Jangi <i>et al.</i> <sup>22</sup>	(V) <i>Akkermansia</i> ( <i>A. municipihila</i> ) (E) <i>Methanobrevibacter</i> ( <i>M. smithii</i> )	(B) <i>Butyricimonas</i> ( <i>B. synergistica</i> )
Chen <i>et al.</i> <sup>23</sup>	(F) <i>Blautia</i> , <i>Dorea</i> (B) <i>Pedobacter</i> (P) <i>Mycoplasma</i> , <i>Pseudomonas</i>	(F) <i>Lactobacillus</i> (B) <i>Parabacteroides</i> (A) <i>Adlercreutzia</i> , <i>Collinsella</i>
Tremlett <i>et al.</i> <sup>24</sup>	(F) <i>Catenibacterium</i> (A) <i>Bifidobacterium</i> (P) <i>Desulfovibrio</i>	(B) <i>Bacteroides</i> ( <i>B. fragilis</i> ), <i>Paraprevotella</i>
Cekanaviciute <i>et al.</i> <sup>26</sup>	(F) <i>Bulleidia</i> , <i>Megamonas</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Mogibacterium</i> (A) <i>Actinomyces</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Varibaculum</i> (P) <i>Acinetobacter</i> , <i>Klebsiella</i> (V) <i>Akkermansia</i> ( <i>A. municipihila</i> )	(F) <i>Acidaminococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Phascolarctobacterium</i> (B) <i>Parabacteroides</i> ( <i>P. distasonis</i> ), <i>Prevotella</i> (P) <i>Aquamonas</i> , <i>Serratia</i>
Swidsinski <i>et al.</i> <sup>16</sup>		(F) <i>Faecalibacterium</i> ( <i>F. prausnitzzi</i> ), <i>Roseburia</i> (B) <i>Bacteroides</i>
Castillo-Álvarez <i>et al.</i> <sup>28</sup>	(F) <i>Anaerostipes</i> , <i>Blautia</i> , <i>Clostridium</i> ( <i>C. bolteae</i> ), <i>Dialister</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> (B) <i>Alistipes</i> ( <i>A. onderdonkii</i> ) (A) <i>Bifidobacterium</i> ( <i>B. longum</i> ), <i>Coriobacterium</i> (P) <i>Sinorhizobium</i>	(F) <i>Eubacterium</i> ( <i>Eubacterium eligens</i> ) (B) <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> ( <i>P. copri</i> ) (P) <i>Pseudomonas</i> (E) <i>Methanobrevibacter</i>
Zeng <i>et al.</i> <sup>29</sup>	(F) <i>Streptococcus</i> ( <i>S. salivarius</i> e <i>S. parasanguinis</i> )	(B) <i>Prevotella</i>
Reynders <i>et al.</i> <sup>31</sup>	(F) <i>Anaerotruncus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Sporobacter</i> (B) <i>Alistipes</i> , <i>Parabacteroides</i> (A) <i>Olsenella</i> (E) <i>Methanobrevibacter</i>	(F) <i>Butyricoccus</i> , <i>Gemmiger</i> , <i>Roseburia</i>
Ventura <i>et al.</i> <sup>33</sup>	(F) <i>Clostridium</i>	
Storm-Larsen <i>et al.</i> <sup>32</sup>		(F) <i>Faecalibacterium</i>

(F): Firmicutes, (B): Bacteroidetes, (A): Actinobacteria, (P): Proteobacteria, (V): Verrucomicrobia, (E): Euryarchaeota.



**Tabela 3.** Estudos que demonstram diferenças na composição do microbioma intestinal entre subgrupos de doentes com EM categorizados por atividade e gravidade de doença

Autor	Diferenças no microbioma intestinal entre diferentes fenótipos de EM
Chen <i>et al.</i> <sup>23</sup>	Menor diversidade alfa na EMSR ativa relativamente a EMSR em remissão; Variação na composição do microbioma intestinal (diversidade beta) entre de doentes com EMSR ativa e EMSR em remissão → microbioma intestinal de EMSR em remissão assemelha-se ao do grupo controlo.
Reynders <i>et al.</i> <sup>31</sup>	Diferenças na diversidade alfa (riqueza de espécies): EM benigna > EMSR não tratada > EMSR tratada com IFN > EMSR ativa; Diferenças nas abundâncias relativas de <i>Butyricoccus</i> , <i>Clostridium IV</i> , <i>Clostridium XVIII</i> , <i>Gemmiger</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Sporobacter</i> entre subgrupos; Abundância de <i>Butyricoccus</i> inversamente relacionada com ARMSS score.
Tremlett <i>et al.</i> <sup>35</sup>	Ausência de <i>Fusobacteria</i> ( <i>Fusobacterium</i> e <i>Leptotrichia</i> ) associada a maior risco de surto precoce na população pediátrica com EMSR.
Cosorich <i>et al.</i> <sup>25</sup>	Maior abundância relativa de <i>Firmicutes</i> , <i>Streptococcus</i> ( <i>S. mitis</i> e <i>S. oralis</i> ) e menor de <i>Bacteroidetes</i> e <i>Prevotella</i> na EMSR ativa relativamente a EMSR em remissão.

EMSR: EM curso surto-remissão, IFN: Interferão, ARMSS: age-related Multiple Sclerosis severity

**Tabela 4.** Estudos que demonstram diferenças na composição do microbioma intestinal com o tratamento modificador de doença.

Autor	Variação do microbioma intestinal com tratamento modificador de doença (EM)
Cantarel <i>et al.</i> <sup>21</sup>	Diferenças na abundância relativa de <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Lactobacillaceae</i> e <i>Clostridium</i> nos doentes com EM sob AG vs. EM sem tratamento.
Jangi <i>et al.</i> <sup>22</sup>	Maior abundância relativa de <i>Prevotella</i> e <i>Sutterella</i> nos doentes com EM sob TMD (IFN $\beta$ e AG) vs. EM sem tratamento Redução de <i>Sarcina</i> nos doentes com EM sob TMD (IFN $\beta$ e AG) vs. EM sem tratamento (mas abundância relativa de <i>Sarcina</i> semelhante entre grupo sem tratamento e controlo)
Cosorich <i>et al.</i> <sup>25</sup>	Maior abundância relativa de <i>Prevotella</i> nos doentes tratados IFN $\beta$ vs. tratados com AG
Castillo Álvarez <i>et al.</i> <sup>28</sup>	Diferença na abundância relativa de <i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> e <i>Lentisphaerae</i> entre doentes com EM sem tratamento e controlos saudáveis não se verifica entre doentes sob IFN $\beta$ 1 e saudáveis; Redução de <i>Proteobacteria</i> nos doentes com EM apenas permanece nos doentes sob IFN $\beta$ 1; <i>Prevotella copri</i> diminuída nos doentes sem tratamento relativamente a grupo controlo, mas a sua abundância nos doentes sob IFN $\beta$ 1 é semelhante à do grupo controlo.
Storm-Larsen <i>et al.</i> <sup>32</sup>	Redução transitória de <i>Bifidobacterium</i> nos doentes com EMSR tratados com DMF; Redução de <i>Bacteroidetes</i> e enriquecimento de <i>Firmicutes</i> (principalmente <i>Faecalibacterium</i> ) após 12 semanas de tratamento com DMF
Katz Sand <i>et al.</i> <sup>49</sup>	Tratamento com DMF associado a diminuição dos géneros <i>Varibaculum</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Rothia</i> , <i>Blautia</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Fusobacterium</i> e <i>Campylobacter</i> ; Tratamento com AG associado a diminuição de <i>Cloacibacterium</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Sutterella</i> , <i>Aggragatibacter</i> , <i>Haemophilus</i> e aumento de <i>Enterococcus</i> , <i>Acidamnococcus</i> , <i>Shingobium</i> , <i>Enterobacter</i> e <i>Pseudomonas</i>
Tremlett <i>et al.</i> <sup>24</sup>	Exposição a tratamento IMD explica 6,8% da variação do microbioma (diversidade beta); Microbioma de doentes com EM sob tratamento IMD assemelha-se ao do grupo controlo; Diferenças nos <i>rate ratio</i> de <i>Actinobacteria</i> , <i>Tenericutes</i> , <i>Cyanobacteria</i> e <i>Ruminococacceae</i> quando EM tratados com IMD e não tratados são comparados a controlos.
Berer <i>et al.</i> <sup>27</sup>	Menor abundância de <i>Akkermansia muniphila</i> nos doentes com EM sob TMD vs. EM sem tratamento.

AG: acetato de glatirâmero; DMF: Fumarato de Dimetilo, EMSR: Esclerose Múltipla curso surto-remissão, IFN: Interferão, IMD: imunomodulador, TMD: tratamento modificador de doença, vs: versus.

## Bibliografia

1. Collaborators GBDMND. Global, regional, and national burden of motor neuron diseases 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2018;17(12):1083-1097. doi:10.1016/S1474-4422(18)30404-6
2. Garg N, Smith TW. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and behavior.* 2015;5(9):e00362. doi:10.1002/brb3.362
3. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology.* 2014;83(3):278-286. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
4. Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple Sclerosis: Current Knowledge and Future Outlook. *European Neurology.* 2014;72(3-4):132-141. doi:10.1159/000360528
5. Nourbakhsh B, Mowry EM. Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology.* 2019;25(3):596-610. doi:10.1212/con.0000000000000725
6. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology.* 2016;13:25. doi:10.1038/nrneurol.2016.187
7. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology.* 2010;9(6):599-612. doi:10.1016/S1474-4422(10)70086-7
8. Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, et al. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Annals of clinical and translational neurology.* 2019;6(9):1905-1922. doi:10.1002/acn3.50862
9. Tremlett H, Bauer KC, Appel-Cresswell S, Finlay BB, Waubant E. The gut microbiome in human neurological disease: A review. *Annals of Neurology.* 2017;81(3):369-382. doi:10.1002/ana.24901
10. Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol.* 2017;595(2):489-503. doi:10.1113/JP273106
11. Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacology & therapeutics.* 2016;158:52-62. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.11.012
12. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet J-P, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology.* 2009;11(10):2574-2584. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x
13. Bauer KC, Huus KE, Finlay BB. Microbes and the mind: emerging hallmarks of the gut microbiota-brain axis. *Cellular Microbiology.* 2016;18(5):632-644. doi:10.1111/cmi.12585
14. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4615-4622. doi:10.1073/pnas.1000082107
15. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011;479(7374):538-541. doi:10.1038/nature10554
16. Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Gille C, Göktas Ö, Reißhauer A, et al. Reduced Mass and Diversity of the Colonic Microbiome in Patients with Multiple Sclerosis and Their Improvement with Ketogenic Diet. *Front Microbiol.* 2017;8:1141-1141. doi:10.3389/fmicb.2017.01141
17. Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet.* 2011;13(1):47-58. doi:10.1038/nrg3129

18. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007;69(2):330-339. doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005
19. Finotello F, Mastrorilli E, Di Camillo B. Measuring the diversity of the human microbiota with targeted next-generation sequencing. *Briefings in Bioinformatics*. 2016;19(4):679-692. doi:10.1093/bib/bbw119
20. Miyake S, Kim S, Suda W, Oshima K, Nakamura M, Matsuoka T, et al. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PLoS one*. 2015;10(9):e0137429-e0137429. doi:10.1371/journal.pone.0137429
21. Cantarel BL, Waubant E, Chehoud C, Kuczynski J, DeSantis TZ, Warrington J, et al. Gut microbiota in multiple sclerosis: possible influence of immunomodulators. *J Investig Med*. 2015;63(5):729-734. doi:10.1097/JIM.0000000000000192
22. Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2016;7:12015-12015. doi:10.1038/ncomms12015
23. Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Paz Soldan MM, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific reports*. 2016;6:28484-28484. doi:10.1038/srep28484
24. Tremlett H, Fadrosch DW, Faruqi AA, Zhu F, Hart J, Roalstad S, et al. Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: a case-control study. *Eur J Neurol*. 2016;23(8):1308-1321. doi:10.1111/ene.13026
25. Cosorich I, Dalla-Costa G, Sorini C, Ferrarese R, Messina MJ, Dolpady J, et al. High frequency of intestinal T(H)17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Sci Adv*. 2017;3(7):e1700492-e1700492. doi:10.1126/sciadv.1700492
26. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(40):10713-10718. doi:10.1073/pnas.1711235114
27. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(40):10719-10724. doi:10.1073/pnas.1711233114
28. Castillo-Álvarez F, Pérez-Matute P, Oteo JA, Marzo-Sola ME. Composición de la microbiota intestinal en pacientes con esclerosis múltiple. Influencia del tratamiento con interferónβ-1b. *Neurología*. 2018. doi:10.1016/j.nrl.2018.04.006
29. Zeng Q, Gong J, Liu X, Chen C, Sun X, Li H, et al. Gut dysbiosis and lack of short chain fatty acids in a Chinese cohort of patients with multiple sclerosis. *Neurochemistry International*. 2019;129:104468. doi:10.1016/j.neuint.2019.104468
30. Cekanaviciute E, Pröbstel A-K, Thomann A, Runia TF, Casaccia P, Katz Sand I, et al. Multiple Sclerosis-Associated Changes in the Composition and Immune Functions of Spore-Forming Bacteria. *mSystems*. 2018;3(6):e00083-00018. doi:10.1128/mSystems.00083-18
31. Reynders T, Devolder L, Valles-Colomer M, Remoortel A, Joossens M, De Keyser J, et al. Gut microbiome variation is associated to Multiple Sclerosis phenotypic subtypes: Gut Microbiome in Multiple Sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2020. doi:10.1002/acn3.51004
32. Storm-Larsen C, Myhr KM, Farbu E, Midgard R, Nyquist K, Broch L, et al. Gut microbiota composition during a 12-week intervention with delayed-release dimethyl fumarate in multiple sclerosis - a pilot trial. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2019;5(4):2055217319888767-2055217319888767. doi:10.1177/2055217319888767

33. Ventura RE, Iizumi T, Battaglia T, Liu M, Perez-Perez GI, Herbert J, et al. Gut microbiome of treatment-naïve MS patients of different ethnicities early in disease course. *Scientific reports*. 2019;9(1):16396-16396. doi:10.1038/s41598-019-52894-z
34. Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Front Microbiol*. 2016;7:1081-1081. doi:10.3389/fmicb.2016.01081
35. Tremlett H, Fadrosch DW, Faruqi AA, Hart J, Roalstad S, Graves J, et al. Gut microbiota composition and relapse risk in pediatric MS: A pilot study. *Journal of the neurological sciences*. 2016;363:153-157. doi:10.1016/j.jns.2016.02.042
36. Manouchehrinia A, Westerlind H, Kingwell E, Zhu F, Carruthers R, Ramanujam R, et al. Age Related Multiple Sclerosis Severity Score: Disability ranked by age. *Mult Scler*. 2017;23(14):1938-1946. doi:10.1177/1352458517690618
37. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1452.
38. Tremlett H, Fadrosch DW, Faruqi AA, Hart J, Roalstad S, Graves J, et al. Associations between the gut microbiota and host immune markers in pediatric multiple sclerosis and controls. *BMC Neurol*. 2016;16(1):182-182. doi:10.1186/s12883-016-0703-3
39. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol*. 2016;7(979). doi:10.3389/fmicb.2016.00979
40. Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2011;17(12):1519-1528. doi:10.3748/wjg.v17.i12.1519
41. Prosberg M, Bendtsen F, Vind I, Petersen AM, Gluud LL. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2016;51(12):1407-1415. doi:10.1080/00365521.2016.1216587
42. Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Wang Y, Begum-Haque S, Dasgupta S, Kasper DL, et al. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunology*. 2010;3(5):487-495. doi:10.1038/mi.2010.29
43. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(27):12204-12209. doi:10.1073/pnas.0909122107
44. Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: Unique gene expression of disease activity. *Annals of Neurology*. 2004;55(3):410-417. doi:10.1002/ana.20008
45. Salehipour Z, Haghmorad D, Sankian M, Rastin M, Nosratabadi R, Soltan Dallal MM, et al. *Bifidobacterium animalis* in combination with human origin of *Lactobacillus plantarum* ameliorate neuroinflammation in experimental model of multiple sclerosis by altering CD4+ T cell subset balance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;95:1535-1548. doi:10.1016/j.biopha.2017.08.117
46. Ezendam J, de Klerk A, Gremmer ER, van Loveren H. Effects of *Bifidobacterium animalis* administered during lactation on allergic and autoimmune responses in rodents. *Clin Exp Immunol*. 2008;154(3):424-431. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03788.x
47. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol*. 2007;150(3):531-538. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03522.x
48. Henke MT, Kenny DJ, Cassilly CD, Vlamakis H, Xavier RJ, Clardy J. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(26):12672-12677. doi:10.1073/pnas.1904099116

49. Katz Sand I, Zhu Y, Ntranos A, Clemente JC, Cekanaviciute E, Brandstadter R, et al. Disease-modifying therapies alter gut microbial composition in MS. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2019;6(1):e517. doi:10.1212/nxi.0000000000000517
50. Tankou SK, Regev K, Healy BC, Tjon E, Laghi L, Cox LM, et al. A probiotic modulates the microbiome and immunity in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2018;83(6):1147-1161. doi:10.1002/ana.25244
51. Saresella M, Mendozzi L, Rossi V, Mazzali F, Piancone F, LaRosa F, et al. Immunological and Clinical Effect of Diet Modulation of the Gut Microbiome in Multiple Sclerosis Patients: A Pilot Study. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1391. doi:10.3389/fimmu.2017.01391
52. Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Salter A, Dorsett Y, Chen L, et al. Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota. *Cell Metab*. 2018;27(6):1222-1235.e1226. doi:10.1016/j.cmet.2018.05.006
53. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222-227. doi:10.1038/nature11053
54. Jeong A, Oleske DM, Holman J. Epidemiology of Pediatric-Onset Multiple Sclerosis: A Systematic Review of the Literature. *Journal of Child Neurology*. 2019;34(12):705-712. doi:10.1177/0883073819845827