

O papel da microbiota na modulação da homeostase dos hospedeiros: correlação entre micobioma intestinal e obesidade

Francis Moreira Borges*
Thaís Oliveira de Paula**
Jacy Gameiro***
Vânia Lúcia da Silva****
Cláudio Galuppo Diniz*****

RESUMO

Os fungos apresentam papel importante na saúde humana, sendo componentes da microbiota humana de diversos sítios anatômicos como, por exemplo, pele, cavidade bucal, trato gastrointestinal e trato geniturinário. São também agentes etiológicos de várias infecções, desde micoses superficiais até sistêmicas. Os fungos participam na regulação do sistema imunológico, podendo promover o surgimento de alergias das vias aéreas superiores. Estão presentes na composição da microbiota intestinal, formando o micobioma. Portanto, seu papel no desenvolvimento da obesidade deve ser considerado, atuando tanto na modulação da resposta imune local quanto através de sua interação com os demais microrganismos da microbiota intestinal. Este trabalho tem como objetivo revisar aspectos da participação microbiana na etiopatogenia da obesidade e discutir a participação dos fungos no micobioma intestinal, sua relação com a obesidade e as perspectivas futuras, com a utilização de metodologias moleculares, para um melhor entendimento do papel dos fungos na microbiota intestinal na saúde e na doença.

Palavras-chave: Microbiota. Fungos. Obesidade

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida pelo aumento do índice de massa corporal (IMC), constituindo uma síndrome metabólica de causa multifatorial. Indivíduos com $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ são considerados como sobrepeso e indivíduos com $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ são classificados como obesos. Biologicamente, é considerada como sendo o acúmulo de adipócitos nos tecidos, devido ao elevado índice de massa corporal (BERNHARD et al., 2013).

Desde 1997 a organização mundial da saúde vem alertando para uma crescente epidemia de obesidade nos países desenvolvidos, a qual levaria um maior risco de desenvolvimento de doenças não infecciosas relacionadas à obesidade (PRENTICE et al., 2006) (DIBAISE et al., 2008). Atualmente a obesidade pode ser considerada uma pandemia (PRENTICE et al., 2006), pois atinge tanto as populações dos países desenvolvidos quanto dos em desenvolvimento,

sendo destacada como um problema de saúde pública mundial (TORRES-FUENTES et al., 2013).

Recentemente, o Ministério da Saúde divulgou uma pesquisa que revela que pela primeira vez mais da metade (52%) da população brasileira apresentava obesidade ou sobrepeso. O levantamento é da Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), e os dados foram coletados em 26 capitais brasileiras e no Distrito Federal no ano de 2012 na população acima de 18 anos de idade (BRASIL, 2013).

A obesidade infantil e o sobrepeso já atingem números alarmantes em muitos países. (BERVOETS et al., 2013). Dados da Pesquisa Nacional sobre Nutrição e Saúde demonstram que 33% da população adulta dos Estados Unidos é obesa e 17% das crianças e adolescentes apresentam sobrepeso (DIXIT, 2008). É comum que as crianças obesas apresentem maior risco para desenvolvimento de comorbidades relacionadas ao excesso de massa

* Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG. E-mail: francismborges@gmail.com.

** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG.

*** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG.

**** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG.

***** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG.

corporal, como por exemplo, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares prematuras (DIBAISE et al., 2008). Outros agravos à saúde também podem estar relacionados ao ganho excessivo de peso, doenças como hipertensão pulmonar, apnéia do sono, distúrbios gastroesofágicos, distúrbios musculares e até câncer (DIBAISE et al., 2008).

A inflamação crônica de baixo grau é a característica marcante de indivíduos obesos, que possuem maiores níveis de citocinas inflamatórias circulantes (BOSELO; ZAMBONI, 2000). O tecido adiposo dos obesos se torna um sítio de células inflamatórias, principalmente macrófagos do tipo M1, que secretam grandes quantidades de citocinas inflamatórias e quimiocinas que atraem um maior número de células inflamatórias, aumentando assim os níveis destas moléculas, que contribuem ativamente para a inflamação sistêmica nestes indivíduos (Haddad; Saade; Safieh-Garabedian, 2002). Estas pessoas podem apresentar níveis alterados de leptina, hormônio relacionado com a saciedade, mas também descrito como importante indutor de respostas inflamatórias do tipo Th1 (ZHAO et al., 2003) (Bernotiene; Palmer; Gabay, 2006) (LAM; LU, 2007).

Além do status imunológico alterado, é sugerido que a composição bacteriana (espécies e abundância) da microbiota intestinal seja única para cada indivíduo (TILG; Kaser, 2011). Por outro lado, alguns autores propõe o conceito de um núcleo microbiano comum entre os diferentes hospedeiros, entretanto, esta proposição tem sido questionada visto que, espécies de núcleo anteriormente proposto podem representar menos de 1% do total de componentes da microbiota intestinal em alguns indivíduos semelhantes (Backhed et al., 2004). Apesar da grande variabilidade na composição de espécies (microbiota), os perfis genéticos funcionais (microbiomas) são semelhantes em indivíduos saudáveis. No entanto, essa redundância funcional pode refletir convergência evolutiva de táxons não relacionados, culminando em dificuldades na compreensão do que constitui a variação saudável ou patológica na estrutura da comunidade microbiana (Duncan et al., 2008) (Delzene; CANI, 2011).

De forma geral, vários estudos têm sugerido a relação entre a obesidade e a microbiota residente intestinal, entretanto esses dados requerem atenção em função da variação regional e social dos indivíduos que pode refletir na qualidade microbiana endógena. Em muitos estudos as diferenças observadas não tem se mostrado homogêneas. Além disso, sugere-se a utilização de diferentes metodologias analíticas e a observação e descrição de um conjunto maior de variáveis que inclua observações intrínsecas no indivíduo, além da simples descrição de peso e IMC,

como a inclusão de dados sociodemográficos e clínico-epidemiológicos (regionalismo), e outros fatores endógenos dos hospedeiros, como características imunológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão de literatura foi realizada por meio do levantamento de dados encontrados nas bases de dados NCBI – PubMed, Scielo, Periódicos Capes e Science Direct. Foram consultados artigos originais e de revisão sobre o tema: Papel da microbiota na modulação da homeostase dos hospedeiros: correlação entre micobioma intestinal e obesidade, utilizando os descritores: micobioma, microbiota intestinal e obesidade. O tempo para análise dos artigos foi de três meses e foram escolhidos os mais relevantes em relação ao tema.

2.1 Obesidade, aspectos clínicos e epidemiológicos

A epidemia mundial de obesidade está suscitando esforços para identificar fatores ambientais e do hospedeiro que afetam o balanço energético (TURNBAUGH et al., 2006). Dentre os fatores ambientais relacionados ao aumento do índice de massa corporal, podem ser destacadas as profundas mudanças nos padrões alimentares mundiais e o custo relativo dos alimentos, responsável pelas transições nos hábitos alimentares (PRENTICE et al., 2006). Alimentos de maior valor energético são consumidos com maior frequência e em maior quantidade. A composição qualitativa e quantitativa da dieta diária varia consideravelmente de refeição para refeição e também de um dia para o outro, levando a variações das taxas metabólicas (EVERARD; CANI, 2013). Fatores genéticos e hábitos como fumo e prática de atividade física regular podem influenciar de forma significativa o aumento ou a redução da massa corporal em cada indivíduo (DIBAISE et al., 2008) (VAEL, et al., 2011) (Torres-Fuentes et al., 2013).

Biologicamente, a obesidade é definida como um excesso de adipócitos, correlacionados com índice de massa corporal (IMC), sendo caracterizada como síndrome metabólica de causa multifatorial, com participação de hormônios, neuropeptídeos e citocinas. Assim, a obesidade tem consequências sobre o eixo neuro-imuno-endócrino (Dixit, 2008) (Moller; Kaufman, 2005). O hipotálamo é o alvo de vários sinais transmitidos periféricamente e também de circuitos neuronais que controlam o balanço

energético e a massa corporal (Williams; Harrold; Cutler, 2000). Por volta de 1940, foi sugerido que alguns núcleos hipotalâmicos podem ser centros reguladores do apetite (hipotálamo lateral) e da saciedade (hipotálamo ventro-medial). A área delimitada pelo núcleo arqueado (ARC), situado perto da base do terceiro ventrículo e imediatamente acima da eminência mediana, é um dos chamados “órgãos circunventriculares”, nos quais a barreira hematoencefálica é modificada especialmente para permitir a entrada de peptídeos e proteínas circulantes, como leptina e insulina, que são considerados sinalizadores da massa corporal. Foi descoberto recentemente que a região ventromedial do hipotálamo é o alvo principal da leptina, que age neste local inibindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético (WILLIAMS, 2001), através de circuitos neuronais que possuem moléculas sinalizadoras orexígenas (leptina) e anorexígenas (grelhina), como o neuropeptídeo Y (NPY), galanina, orexina, dentre outros (DIXIT, 2008) (Sahu, 2003).

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm relacionado o sistema neuroendócrino ao sistema imunológico, estudando a interação dos hormônios, células, neuropeptídeos e citocinas na fisiologia dos sistemas e na resposta imunológica (Velloso; Savino; Mansour, 2009) (Dardenne, 2009). Por exemplo, uma inflamação periférica estimula a liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que por sua vez regula a resposta ao stress através da produção de hormônio adenocorticotrófico (ACTH), este hormônio promove a síntese e a liberação de glucocorticóides, os quais tem potente ação anti-inflamatória, diminuindo as respostas imunológicas tanto humorais quanto celulares (La Cava; Matarese, 2004). Ainda, existem mediadores comuns entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune, como IL-1, IL-6 e TNF- α , que atuam modulando a inflamação através do eixo hipotálamo- pituitária- adrenal (HPA) (Turnbull; Rivier, 1999) (HADDAD; SAADE; SAFIEH-GARABEDIAN, 2002).

O tecido adiposo tem importantes funções como órgão endócrino ao produzir diversos hormônios e moléculas sinalizadoras, como a leptina, a qual tem função de regulação do sistema imune, pois está envolvida na deficiência da resposta imune humoral e celular, a adipocitocina, atuando como protetor contra a inflamação e as interleucinas secretadas pelos adipócitos (IL-6 e IL-8). A leptina ativa linfócitos T, aumenta a resposta Th1, ativa monócitos, entre outros. Portanto a leptina pode ser considerada uma citocina pró-inflamatória (ALVEZ, 2006).

A inflamação do tecido adiposo ocorre como uma consequência da obesidade, caracterizada pela

infiltração e ativação de células do sistema imune, elevando a síntese de citocinas e quimiocinas. Esta inflamação crônica contribui com os mecanismos de indução da resistência a insulina e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do diabetes tipo 2. Vários estudos buscam identificar as subpopulações de células imunológicas que estão envolvidas no processo inflamatório do tecido adiposo, compreender os mecanismos que levam a inflamação deste tecido e desenvolver imunoterapias para reverter este processo (HAN; LEVINGS, 2013). O aumento nos níveis de leptina circulante, um dos principais hormônios associados à obesidade, juntamente a resistência central a este hormônio relacionada com os níveis reduzidos de grelina e adipocitocina estão relacionadas com o processo inflamatório observado na obesidade (SIEGMUND et al., 2002).

Além disso, vários fatores como idade, estilo de vida, alimentação, influenciam a composição da microbiota intestinal. A mudança na dieta é um fator promissor na terapêutica da obesidade, por ser um meio de fácil intervenção (BRANDT et al., 2006). Numerosos estudos utilizando modelos animais e humanos demonstraram que a microbiota pode influenciar a homeostase energética do hospedeiro por de vários mecanismos (Qin et al., 2010). Porém, estudos adicionais, de caráter regional ainda são necessários para uma compreensão mais detalhada da relação entre a composição microbiota intestinal e os variados fenótipos metabólicos como a obesidade, e de como uma modulação destes microrganismos poderia ser benéfica para alteração destes fenótipos.

Neste sentido é aceito que as bactérias da microbiota intestinal contribuem para a maturação do sistema imune e diminuição de possíveis reações alérgicas (BRANDT et al., 2006) (MAZMANIAN et al., 2005), porém não é conhecida a relação da microbiota fúngica intestinal com a modulação do sistema imune do hospedeiro (CUI et al., 2013)

2.2 Implicações da microbiota intestinal no desenvolvimento e manutenção da obesidade

A microbiota intestinal humana é constituída por uma grande quantidade de microrganismos distribuídos de maneira não homogênea, de acordo com as características de cada porção intestinal, sendo o cólon a parte que alberga o maior número de microrganismos devido, principalmente, à grande quantidade de nutrientes ali disponíveis, ausência de secreções intestinais e ao peristaltismo lento característico do local (Vilela, 2004) (QIN et al., 2010). Estima-se que a microbiota intestinal contenha

cerca de 150 vezes mais genes do que o genoma humano (FLINT, 2011).

A participação das bactérias na composição da microbiota humana é bem estabelecida, sendo conhecidas as principais espécies bacterianas em alguns sítios anatômicos, como pele, cavidade oral, trato geniturinário e trato gastrointestinal (CUI et al., 2013).

A enorme quantidade e diversidade de microrganismos presentes no trato intestinal contribuem com diversas funções, como: função imunomoduladora, contribuindo para a maturação local e sistêmica de uma resposta imune e geração de uma imunotolerância; metabolismo de drogas; favorecimento do desenvolvimento de microvilosidades e importantes funções metabólicas (Villela, 2004) (TAGLIABUE; ELLI, 2013) (DIBAISE et al., 2008) (Turnbaugh, 2006).

Somente nos últimos dez anos, no entanto é que o microbioma humano como um novo conceito microbiológico, o qual engloba a pesquisa de todos os microrganismos (bactérias, fungos, arqueias e vírus) como componentes da microbiota de um determinado sítio anatômico, vêm sendo considerado. Essa conotação mudou em 2010, quando o termo micobioma (uma combinação das palavras micologia e microbioma) foi utilizado pela primeira vez para se referir ao microbioma fúngico (CUI et al., 2013). Existem diversas razões para incluir o estudo da participação dos fungos na constituição da microbiota das diferentes partes do corpo. Alguns fatores reforçam esta mudança: (I) a incidência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente nas duas últimas décadas, principalmente as oportunistas, com o crescimento do número de pacientes imunossuprimidos, infectados pelo vírus HIV, transplantados ou em quimioterapia para câncer; (II) doenças que eram consideradas como não associadas a fungos, hepatite, fibrose cística e doenças intestinais inflamatórias, hoje parecem estar relacionadas ao micobioma de determinados locais e (III) a interação entre os diferentes biomas e entre o hospedeiro e o micobioma são críticas na progressão das doenças (CUI et al., 2013).

O micobioma de diferentes partes do corpo interage entre si. Atualmente a interação melhor compreendida é a que ocorre entre os fungos do trato gastrointestinal e os do trato respiratório: um distúrbio causado por *Candida albicans* no micobioma intestinal pode resultar em doença alérgica pulmonar induzida por *Aspergillus fumigatus* no micobioma pulmonar. Alguns estudos apontam para a importância da utilização de terapia prebiótica e probiótica na regulação do microbioma intestinal, no qual a diversidade

bacteriana intestinal aumentou significativamente enquanto que a diversidade fúngica, principalmente os oportunistas e patogênicos diminuiu. Este efeito resulta na restauração da mucosa intestinal protetiva relacionada à microbiota. A redução ou alteração da microbiota intestinal bacteriana pode resultar em patologias, como por exemplo, a obesidade (CUI et al., 2013).

Além disso, recentemente tem sido sugerido que indivíduos obesos e eutróficos apresentam diferenças na microbiota intestinal (DIBAISE et al., 2008). Um exemplo claro desta influência é o uso de adoçantes artificiais, capazes de induzir a intolerância à glicose, através de alterações na composição e funcionalidade da microbiota bacteriana intestinal, podendo levar ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 (SUEZ et al., 2014).

Evidências recentes têm sugerido o envolvimento da microbiota intestinal na regulação energética, assim como no processo inflamatório, sendo, portanto, um fator ambiental relacionado à fisiopatologia da obesidade. Diversos estudos utilizando modelos animais têm sugerido que a composição da microbiota intestinal é diferenciada em indivíduos obesos e eutróficos (BERVOETS et al., 2013).

É aceito que alguns microrganismos fermentam componentes da dieta não digeríveis, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato (Villela, 2004) (Turnbaugh, 2006) (CANI; DELZENNE, 2009). Estes são facilmente absorvíveis e, estima-se que sejam responsáveis por 10% da energia total da dieta (CANI; DELZENNE, 2009). O acetato é captado pelo fígado, onde serve como substrato para a gliconeogênese, síntese de colesterol e triglicerídeos (MUSSO et al., 2010). A capacidade de fermentar carboidratos à ácidos graxos de cadeia curta varia entre as espécies microbianas, de modo que a composição da microbiota intestinal de um indivíduo influencia na maior ou menor captação de energia (Turnbaugh, 2006).

O propionato e o acetato são ligantes fisiológicos de dois receptores acoplados a proteína G (Gpr): Gpr41 e Gpr43, expressos em diversas células (imunes, endócrinas e adiposas), ativando-os (TURNBAUGH, 2006). A ativação da Gpr43 contribui para a inibição da lipólise e diferenciação dos adipócitos, promovendo uma expansão do tecido adiposo em animais submetidos a uma dieta rica em gorduras (FARIAS et al., 2011). A interação dos AGCC com os receptores Gpr induz, também, à secreção do hormônio peptídeo YY (PYY) envolvido com a redução da motilidade intestinal, permitindo,

dessa forma, maior absorção de nutrientes no lúmen intestinal (Villela, 2004) (Qin et al., 2010).

Além da maior absorção de AGCC, a microbiota intestinal promove, também, uma maior absorção de glicose a partir da fermentação de componentes não digeríveis da alimentação, levando a um aumento da glicemia e, conseqüentemente, insulinemia, dois fatores chaves na regulação da lipogênese. A glicose e a insulina também são importantes no processo de lipogênese de novo no fígado, através da expressão de várias enzimas chaves como Acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintetase (FAS) e de suas proteínas mediadoras ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) e da SREBP-1 (sterol responsive element binding protein). Este aumento foi demonstrado em camundongos “germ free” após a colonização do seu trato gastrointestinal (Loos et al., 2008) (Lee; Mazmanian, 2010).

De acordo com a literatura, a microbiota intestinal está implicada, ainda, com a inibição seletiva do fasting-induced adipose factor (Fiaf), hormônio produzido pela mucosa intestinal, e que atua como inibidor circulante da Lipoproteína lipase (LPL), privilegiando o acúmulo de triglicérides no adipócitos e diminuindo a lipólise (Villela, 2004) (Qin et al., 2010) (BRANDT et al., 2006) (TURNBAUGH, 2006) (Loos et al., 2008) (Lee; Mazmanian, 2010).

Assim, embora o papel das bactérias intestinais na modulação da resposta imune sistêmica e da fisiologia intestinal seja amplamente discutido, os efeitos de outros microrganismos comensais são desconhecidos (KIM et al., 2014). Alguns autores relatam um aumento na quantidade de fungos de cerca de 40 vezes após o tratamento de ratos com antibióticos e retorno as quantidades iniciais após o fim do tratamento, exceto *Candida*, a qual permanece mais abundante do que antes do tratamento (DOLLIVE, 2013). O aumento de fungos comensais da microbiota intestinal, em camundongos tratados com antibióticos podem induzir inflamações alérgicas das vias aéreas (KIM et al., 2014).

No trato gastrointestinal humano, a levedura *Candida albicans*, o fungo mais descrito na literatura como membro da microbiota intestinal, pode provocar, por translocação, infecções sistêmicas. Os enterócitos do epitélio intestinal secretam uma grande quantidade e diversidade de muco, o qual tem uma importante função na limitação da multiplicação das células de *C. albicans* neste tecido. Essas leveduras secretam aspartil proteinase, enzima capaz de degradar o muco intestinal, o que contribui para a patogenicidade da levedura, facilitando sua penetração na barreira mucosa e subsequente adesão e invasão nas células epiteliais. Uma variedade de

adesinas fúngicas estão envolvidas na ligação a proteínas de superfície da célula hospedeira, incluindo componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e fibrinogênio (SILVA et al., 2014).

Embora algum conhecimento sobre o papel dos fungos na fisiologia do trato gastrointestinal seja disponível, percebe-se a necessidade de estudos prospectivos do microbioma intestinal para suscitar inferências sobre a interação fungo-hospedeiro na obesidade pela comparação da microbiota intestinal e do perfil imunológico entre indivíduos obesos e eutróficos previamente caracterizados em relação ao perfil nutricional, bioquímico e características clínico-epidemiológicas.

2.3 Métodos de estudo de ecossistemas microbianos intestinais

Através da utilização de métodos moleculares de investigação, pesquisadores sugeriram que o trato gastrointestinal humano contém aproximadamente 1012 microrganismos por mililitro de conteúdo luminal, composto por pelo menos 1800 gêneros e aproximadamente 15000 a 36000 espécies bacterianas diferentes (DIBAISE et al., 2008). Já foram descritos cerca de 50 filos bacterianos compondo a microbiota intestinal, entretanto dois deles são dominantes: Bacteroidetes e Firmicutes (MORALES et al., 2010) (Brandt et al., 2006). Os recém-nascidos são estéreis, no momento do nascimento, não apresentando microbiota intestinal. Nos primeiros dias de vida, começam a adquirir a sua microbiota do trato gastrointestinal, se estabilizando por volta dos dois anos de idade. Após este período, esta comunidade já adquire as mesmas características da idade adulta (BRANDT et al., 2006).

Os trabalhos atuais revelam que a variação na composição e diversidade da microbiota intestinal, caracterizada pelas alterações qualitativas e quantitativas dos filos, gêneros e espécies bacterianas foi correlacionada a obesidade. O primeiro estudo realizado revelando estas alterações foi realizado em ratos obesos e demonstrou um aumento de Firmicutes e diminuição de Bacteroidetes na microbiota intestinal (EVERARD; CANI, 2013).

Diversos estudos são realizados para avaliar a participação das bactérias na microbiota intestinal, entretanto, a diversidade fúngica deste ecossistema é pouco conhecida (GOUBA, et al., 2014). Isso se deve em parte a utilização de técnicas dependentes de cultivo e caracterização morfológica e fisiológica dos fungos, o que restringe a identificação apenas dos cultiváveis (SCUPHAM et al., 2006).

As técnicas de cultivo básicas de fungos remontam a década de 1920 e consistem na inoculação das amostras em meios de cultura sólidos em placas de Petri ou frascos contendo meios de cultura líquidos estéreis. Os resultados dos experimentos são feitos visualmente, através da avaliação do crescimento das estruturas fúngicas e também de modificações do meio de cultura devido a sua composição. Os métodos de cultura de fungos têm evoluído muito nas últimas décadas. Entretanto organismos encontrados em pequenas concentrações ou aqueles que requerem interações com outros organismos não podem ser identificados pelos métodos clássicos de cultivo (CUI et al., 2013).

Assim como as bactérias não cultiváveis, os fungos não cultiváveis compreendem a maior parte do microbioma humano (CUI et al., 2013). Por exemplo, podemos citar o trabalho de Chen et al., 2011, onde somente dois fungos foram obtidos por métodos de cultura: *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida* spp., de um total de 37 fungos intestinais relatados, que possuem correlação direta com a hepatite B crônica (CHEN, 2011).

As limitações dos métodos dependentes de cultivo levaram nos últimos vinte anos, a introdução de abordagens independentes de cultivo. Assim, novas metodologias para a classificação dos fungos que não requerem cultivo foram desenvolvidas, tais como análises de polimorfismo dos comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP), impressão digital de fragmentos de DNA codificador para rRNA (OFRG), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e hibridização in situ (CUI et al., 2013).

O sequenciamento direto dos genes dos fungos tem-se mostrado o melhor método para caracterização do microbioma. Além disso, com o desenvolvimento das novas plataformas de sequenciamento (454 Roche, Illumina, HiSeq e MiSeq, Ion Torrent) tem apresentado uma melhor relação custo – benefício quando comparada a metodologia clássica de Sanger (CUI et al., 2013).

A seleção de regiões genômicas alvos é uma técnica comum para estudo de diversidade fúngica, assim como ocorre para os estudos de diversidade bacteriana do microbioma. O gene RNA ribossomal é a região alvo mais comumente utilizada, visando principalmente a subunidade menor 18S do rDNA, a subunidade maior 28S do rDNA e a região dos espaçadores internos transcritos (ITS). Entretanto, o RNA 28S vem sendo gradualmente eliminado como região alvo, devido à ausência de diferenciação para muitas espécies fúngicas (CUI et al., 2013).

Até o momento não existe consenso de qual seria a melhor região alvo, 18S ou ITS. Comparada com a

região alvo 18S, a ITS é mais diversificada permitindo melhor classificação filogenética (identificação de gêneros). Entretanto, a alta conservação da região 18S, facilita a amplificação do rDNA fúngico. A escolha de qual região dentro da região alvo ITS deve ser criteriosa, pois iniciadores ITS-1 e ITS-1F devem ser utilizados para amplificação dos basidiomicetos e iniciadores ITS-2 e ITS-4 para amplificação dos ascomicetos (CUI et al., 2013).

Existem poucos relatos da presença de organismos eucariotos na microbiota intestinal que reflitam a abundância ou diversidade de fungos entéricos (SCUPHAM et al., 2006) (GOUBA, et al., 2014). Um dos primeiros estudos para avaliar a micobiota intestinal utilizou como modelo ratos. Os principais filos de fungos descritos foram Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota e Zygomycota. Os gêneros encontrados foram *Acremonium*, *Monilia*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Scleroderma*, *Catenomyces*, *Spizellomyces*, *Neocallimastix*, *Powellomyces*, *Entophlyctis*, *Mortierella*, *Smittium* e a ordem Mucorales (SCUPHAM et al., 2006).

Recentemente um estudo revelou a diversidade de fungos leveduriformes, filamentosos e também organismos protistas na microbiota intestinal. Foram avaliadas fezes de sete indivíduos de quatro países tropicais, dentre eles o Brasil. Foram identificadas 38 espécies de fungos por técnicas de cultivo e técnicas moleculares. Os fungos *Malassezia* sp., *Trichosporon* sp., e *Candida* sp. foram encontrados em todas as amostras analisadas, sugerindo distribuição mundial destes, mas outros estudos são necessários para caracterização completa deste microbioma (GOUBA, et al., 2014).

Em outra abordagem, a avaliação de amostras de fezes de dez indivíduos saudáveis, por de técnicas moleculares, revelou a presença dos seguintes fungos: *Wallemia*, *Trichocomaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Rhodotorula*, *Pleosporaceae*, *Metschnikowiaceae*, *Cystofilobasidiaceae*, *Ascomycota*, *Amphisphaeriaceae* e *Agaricaceae* (DOLLIVE et al., 2012).

3 DISCUSSÃO

A obesidade, atualmente, configura-se como um sério problema de saúde pública¹, sendo reconhecida como um fator negativo associado a um grande número de doenças como diabetes do tipo 2, doenças vasculares, cardíacas e câncer (Speakman, 2004) (DIXIT, 2008). Suas complicações e implicações metabólicas são consideradas os principais desafios a serem combatidos no século XXI, uma vez que o número de obesos é crescente em todo o mundo,

atingindo inclusive os países mais pobres ou em desenvolvimento (PRENTICE et al., 2006).

O aumento do número de indivíduos obesos e de doenças associadas à obesidade possui um efeito substancialmente negativo na longevidade: redução de 5 a 20 anos na expectativa de vida, dependendo do grau de obesidade (Fontaine; Barofsky, 2001). Dados originados da Pesquisa Nacional sobre Nutrição e Saúde, realizada nos Estados Unidos, mostrou que 33% da população adulta são obesos e 17% das crianças e adolescentes apresentam sobrepeso (Mokdad et al., 2003) (Ogden; Carroll; Flegal, 2008). Este aumento da obesidade entre os mais jovens é um fato preocupante, uma vez que eles apresentarão riscos associados à obesidade durante um longo período de suas vidas (Caballero, 2007).

Além do status imunológico alterado, é sugerido que a composição bacteriana (espécies e abundância) da microbiota intestinal seja única para cada indivíduo. Por outro lado, alguns autores propõe o conceito de um núcleo microbiano comum entre os diferentes hospedeiros, entretanto, esta proposição tem sido questionada visto que, espécies de núcleo anteriormente proposto podem representar menos de 1% do total de componentes da microbiota intestinal em alguns indivíduos semelhantes (MORALES et al., 2010) (Brandt et al., 2006). Apesar da grande variabilidade na composição de espécies (microbiota), os perfis genéticos funcionais (microbiomas) são semelhantes em indivíduos saudáveis. No entanto, essa redundância funcional pode refletir convergência evolutiva de táxons não relacionados, culminando em dificuldades na compreensão do que constitui a variação saudável ou patológica na estrutura da comunidade microbiana (TRAYHURN; WOOD, 2004).

De forma geral, vários estudos têm sugerido a relação entre a obesidade e a microbiota residente intestinal, entretanto esses dados requerem atenção em função da variação regional e social dos indivíduos que pode refletir na qualidade microbiana endógena (BRANDT et al., 2006). Em muitos estudos as diferenças observadas não tem se mostrado homogêneas. Além disso, sugere-se a utilização de diferentes metodologias analíticas e a observação e descrição de um conjunto maior de variáveis que inclua observações intrínsecas no indivíduo, além da simples descrição de peso e IMC, como a inclusão de dados sociodemográficos e clínico-epidemiológicos (regionalismo), e outros fatores endógenos dos hospedeiros, como características imunológicas.

Assim, as proposições sobre a participação microbiana na etiopatogenia da obesidade reafirma que o sempre foi um desafio para os pesquisadores:

o conhecimento das comunidades microbianas dos diferentes ambientes. A limitação destes estudos no passado foi principalmente devido às metodologias usadas. Inicialmente as investigações eram basicamente observações microscópicas (EIKELBOOM, 1975), porém as diferentes populações bacterianas não podiam ser distinguidas. A partir de métodos baseados em cultivo e isolamento, algumas bactérias começaram a ser identificadas, e essa metodologia foi indispensável para aumentar a compreensão a respeito de organismos específicos (GILBRIDE; LEE; BEAUDETTE, 2006).

A grande maioria dos microrganismos não pode ser facilmente cultivada, assim essas técnicas baseada em cultura selecionavam apenas os micro-organismos heterótrofos que melhor se adaptavam as condições de crescimento dos meios gerais de cultivo. Dessa maneira a real composição e diversidade da comunidade microbiana dos diversos ecossistemas eram subestimadas (GILBRIDE; LEE; BEAUDETTE, 2006) (WARD; WELLER; BATESON, 1990). Ainda sobre a capacidade de cultivo, em quase todos os sistemas, estima-se que o número de bactérias cultiváveis é extremamente pequeno, menor que 1% (WARD; WELLER; BATESON, 1990).

Alguns grupos de pesquisa têm utilizado técnicas de sequenciamento de nova geração para caracterizar as diferentes populações microbianas, revelando assim que o microbioma humano difere profundamente em diferentes regiões do corpo e entre indivíduos. As diferenças entre as regiões do corpo estão associadas com disponibilidade de nutrientes, água, oxigênio e outros fatores específicos de cada local. A origem das diferenças entre indivíduos, não está totalmente esclarecida, entretanto reflete diferenças na colonização durante a vida e diferentes exposições ambientais, como por exemplo, utilização de antibioticoterapia. Outra exposição ambiental não completamente esclarecida é a dieta (HOFFMANN et al., 2013).

Em relação à participação fúngica na homeostase e, portanto saúde dos hospedeiros, considera-se que o estudo do micobioma humano possa contribuir para expansão do conhecimento sobre a real significância e papel do microbioma humano. Diversos micobiomas em diferentes sítios anatômicos tem sido propostos e diversos padrões de associação fúngica são associados a diferentes patologias (CUI et al., 2013).

O micobioma contribui para a doença através da interação entre este e os diferentes biomas, bem como através da interação direta com o hospedeiro. Estudos futuros de caracterização do micobioma serão importantes para o entendimento da patogênese das doenças, bem como para o desenvolvimento

de novas terapias. Portanto, a caracterização do microbioma intestinal torna-se muito importante para o entendimento do processo da obesidade e para a seleção de novos alvos terapêuticos contra essa nova epidemia mundial, uma vez que pouco se sabe da participação dos fungos da etiopatogenia da doença.

4 CONCLUSÃO

De forma geral, vários estudos têm sugerido a relação entre a obesidade e a microbiota residente intestinal, entretanto esses dados requerem atenção em função da variação regional e social dos indivíduos que pode refletir na qualidade microbiana endógena. Em muitos estudos as diferenças observadas não tem se mostrado homogêneas. Além disso, sugere-se a utilização de diferentes metodologias analíticas e a observação e descrição de um conjunto maior de variáveis que inclua observações intrínsecas no indivíduo, além da simples descrição de peso e IMC, como a inclusão de dados sociodemográficos e clínico-epidemiológicos (regionalismo), e outros fatores

endógenos dos hospedeiros, como características imunológicas.

Neste contexto, a participação dos fungos na microbiota intestinal não está bem esclarecida, ao contrário do observado para as bactérias, apesar das divergências metodológicas. O principal fungo descrito na literatura como integrante da microbiota humana é a levedura *Candida albicans*, e isto se deve em grande parte pela utilização de métodos dependentes de cultura para o estudo dos fungos.

A aplicação de métodos independentes de cultura, baseados em técnicas moleculares de estudo constitui um grande avanço para a avaliação do microbioma intestinal humano. Entretanto, atualmente, poucos estudos estão voltados para o conhecimento da diversidade fúngica existente neste sítio anatômico.

A determinação da composição do microbioma intestinal, bem como sua relação com os demais organismos presentes neste ecossistema, como por exemplo, as bactérias e seu envolvimento na modulação do sistema imune contribuirão significativamente para o entendimento da participação dos fungos na fisiopatologia da obesidade.

The role of microbiota in the modulation hosts homeostasis: correlation between obesity and intestinal mycobiome

ABSTRACT

The fungi play an important role in human health and are components of the human microbiota anatomical sites such as skin, oral cavity, gastrointestinal and genitourinary tract. They are also etiologic agents of various infections, from superficial and systemic mycoses. The fungi are involved in regulating the immune system and may promote the onset of upper airway allergies. They are present in the composition of the intestinal microbiota, forming the mycobiome. Therefore, its role in the development of obesity should be considered, acting both in the modulation of local and through immune response its interaction with other microorganisms in the intestinal microbiota. This paper aims to review the involvement of microorganisms in the obesity etiopathogeny and discuss the involvement of fungi in the intestinal microbiome, its relationship with obesity and future prospects, with the use of molecular methods to better understand the role of fungi in the intestinal microbiota in health and disease.

Keywords: Microbiota, Fungi, Obesity

REFERÊNCIAS

BACKHED F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, no. 44, p. 15718–15723, 2004.

BERNHARD, F. et al. Functional relevance of genes implicated by obesity genome-wide association study signals for human adipocyte biology. **Diabetologia**. Berlin, v. 56, p. 311-322, 2013.

BERNOTIENE E.; PALMER G.; GABAY C. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. **Arthritis research & therapy**, London, v.8, p. 217, 2006.

BERVOETS, L. et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: across-sectional study. **Gut Pathogens**, London, v.5, no. 10, p. 1-10, 2013.

BOSELLO O.; ZAMBONI M. Visceral obesity and metabolic syndrome. **Obesity reviews** : an official journal of the International Association for the Study of Obesity, Oxford, v. 1 p. 47-56, 2000.

- BRANDT, K. G. et al. Importância da microflora intestinal. **Pediatrics**, São Paulo, v. 28, n. 2, p.117-127, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2013. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no distrito federal em 2013 (Série G. Estatística e Informação em Saúde). Brasília, p.1-120, 2014.
- CABALLERO B. The global epidemic of obesity: an overview. **Epidemiologic reviews**, Baltimore, v. 29, p. 1-5. 2007.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N.M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 15, p. 1546-1558, 2009.
- CHEN, Y. et al. Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York v. 70, n. 4, p. 492-498, ago. 2011.
- CUI, J. A. et al. The human mycobiome in health and disease. **Genome Medicine**, London, v.5, no.63, p.1-12, 2013.
- DARDENNE M. et al. Growth hormone modulates migration of developing T cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1153, p. 1-5, 2009.
- DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. **Annual review of nutrition**, Palo Alto, v. 31, p. 15-31, 2011
- DIBAISE, J.K. et al. Gut Microbiota and Its Possible Relationship with Obesity. **Mayo Clinic Proceedings**, Oxford, v.83, no.4, p.460-469, 2008.
- DIXIT, V. D. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. **Journal of Leukocyte Biology**. New York, v.84, p.882-892, out. 2008.
- DOLLIVE, S. et al. A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. **Genome Biology**, London, v.13, p.1-13, 2012.
- DOLLIVE, S. et al. Fungi of the Murine Gut: Episodic Variation and Proliferation during Antibiotic Treatment. **PloS One**, San Francisco, v.8, no. 8, p. 1-12, ago. 2013.
- DUNCAN, S.H. et al. Human colonic microbiota associated with diet obesity and weight loss. **International journal of obesity**, London, v. 32, p. 1720-1724, 2008.
- EIKELBOOM, D.H. Filamentous organisms observed in activated sludge. **Water Research**, Oxford, v. 9, p. 365-388, 1975.
- EVERARD, A.; CANI, P.D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Amsterdam, v.27, p. 73-83, 2013.
- FARIAS, M. N. et al. Microbiota intestinal: rol in obesidad. Revista chilena de nutrición : órgano oficial de la Sociedad Chilena de Nutrición, **Bromatología y Toxicología**, Santiago.. v. 38, n. 2, 2011.
- FLINT, H. J. Obesity and the gut microbiota. **Journal of clinical gastroenterology**, New York, v. 45, no. 3, p. 128-132, 2011.
- FONTAINE K.R.; BAROFSKY I. Obesity and health-related quality of life. **Obesity reviews** : an official journal of the International Association for the Study of Obesity, Oxford, v. 2, p. 173-182, 2001.
- GILBRIDE, K.A.; LEE, D.Y.; BEAUDETTE, L.A.. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, p. 1-20, 2006.
- GOUBA, N. et al. Eukaryote Culturomics of the Gut Reveals New Species. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, no. 9, p.1-5, set. 2014.
- HADDAD J.J.; SAADE N.E., SAFIEH-GARABEDIAN B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of neuroimmunology**, Amsterdam, v.133, p.1-19, 2002.
- HAN, J. M.; LEVINGS, M. K. Adipose Inflammation Immune Regulation in Obesity-Associated. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v.191, p. 527-533, jul. 2013.
- HOFFMANN, C. et al. Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: Correlations with Diet and Bacterial Residents. **PloS One**, San Francisco, v.8, no. 6, p. 1-12, jun. 2013.
- KIM, Y. et al. Gut Dysbiosis Promotes M2 Macrophage Polarization and Allergic Airway Inflammation via Fungi-Induced PGE2. **Cell Host and Microbes**, Cambridge, v.15, no. 1, p. 95-102, jan. 2014.
- LA CAVA A.; MATARESE G. The weight of leptin in immunity. Nature reviews. **Immunology**, London, v. 4, p. 371-379, 2004.
- LAM Q.L.; LU L. Role of leptin in immunity. **Cellular & molecular immunology**, Beijing, v.4, p.1-13, 2007.
- LEE Y.K.; MAZMANIAN S.K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? **Science**, London, v. 330, no. 6012 p. 1768-1773, 2010.
- LOOS R. J. et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. **Nature genetics**, New York, v. 40, no. 6, p. 768-775, 2008.

- MAZMANIAN, S. K. et al. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. **Cell**, Cambridge, v. 122, no. 1, p.107-118, jul. 2005.
- MOKDAD A. H. et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **Jama**, Chicago, v.289, p. 76-79, 2003.
- MOLLER D. E.; KAUFMAN K. D. Metabolic Syndrome: A Clinical and Molecular Perspective. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, no. 56 p. 45, 2005.
- MORALES, P. et al. La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidade. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v.138, n. 8 p.1020-1027, 2010.
- MUSSO, G. et al. Obesity, diabetes and gut microbiota : The hygiene hypotheses expanded?. **Diabetes care**, New York, v. 33, no. 10, p. 2277-2284, 2010.
- OGDEN C.L.; CARROLL M.D.; FLEGAL K.M. High body mass index for age among US children and adolescents, 2003-2006. **Jama**, Chicago, v. 299, p. 2401-2405, 2008.
- PRENTICE, A. M. et al. The emerging epidemic of obesity in developing countries. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 35, p.93-99, 2006.
- QIN J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, London, v. 464, n.7285, p. 59-65, 2010.
- SAHU A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. **Frontiers in neuroendocrinology**, New York, v. 24, p. 225-253, 2003.
- SCUPHAM, A. j. et al. Abundant and Diverse Fungal Microbiota in the Murine Intestine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, no. 1, p. 793-801, jan. 2006.
- SIEGMUND, B. et al. Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. **European Journal of Immunology**. Weinheim, v. 32, no. 2, p.552-560, fev. 2002.
- SILVA, R. C. et al. Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 2-9, 2014.
- SPEAKMAN J. R. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. **The Journal of nutrition**, Springfield, v. 134, p. 2090S-2105S, 2004.
- SUEZ, J. et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**, London, v.0, no. 0, p.1-17, 2014.
- TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives. **Nutrition**, metabolism and cardiovascular diseases, Amsterdam, v. 23, p. 160-168, 2013.
- TILG H.; KASER A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 121, no .6, p.2126-2132, 2011.
- TORRES-FUENTES, C. et al. A natural solution for obesity: Bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. **Nutritional Neuroscience**, Boca Raton, v.0, no.0, p.1-18, 2013.
- TRAYHURN, P.; WOOD, I. S.. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British journal of nutrition**, Cambridge, v. 92, p. 347-355, 2004.
- TURNBAUGH P.J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, London, v. 444, no. 7122, p. 1027-1031, dez. 2006.
- TURNBULL A.V.; RIVIER C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 79, p. 1-71, 1999.
- VAEL, C. et al. Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study. **Gut Pathogens**, London, v.3, no. 8, p. 1-7, 2011.
- VELLOSO L.A.; SAVINO W; MANSOUR E. Leptin action in the thymus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1153 p. 29-34, 2009
- VILLELA N.B. et al. Quality of life of obese patients submitted to bariatric surgery. **Nutrición hospitalaria**, Madrid, v.19, no. 6, p. 367-371, 2004.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, London, v. 345, p. 63-65, 1990.
- WILLIAMS G. et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiology & behavior**, Oxford, v. 74, p. 683-701, 2001.
- WILLIAMS G.; HARROLD J. A.; CUTLER D. J. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 59, p. 385-396, 2000.
- ZHAO et al. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.300, p.247-252, 2003.

Enviado em //

Aprovado em //