



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Cristo Paiva

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Alexandra Albuquerque e da Professora Doutora Bárbara Rocha e Monografia intitulada “A Influência do Microbiota Intestinal e Transplante de Fezes no tratamento do Cancro Colorretal” sob a orientação da Professora Doutora Bárbara Rocha, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D COIMBRA

Beatriz Cristo Paiva

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Alexandre Albuquerque e da Professora Doutora Bárbara Rocha e Monografia intitulada “A Influência do Microbiota Intestinal e Transplante de Fezes no tratamento do Cancro Colorretal” sob a orientação da Professora Doutora Bárbara Rocha, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023

Eu, Beatriz Cristo Paiva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2018283267, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A Influência do Microbiota Intestinal e Transplante de Fezes no tratamento do Cancro Colorretal” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 1 de setembro de 2023.

Beatriz Cristo Paiva

(Beatriz Cristo Paiva)

“ All our dreams can come true,
If we have the courage to pursue them.”

Walt Disney

Agradecimentos

Aos meus pais e avós pelo apoio incondicional, por estarem sempre lá para mim, por me ensinarem a nunca desistir e a lutar pelos meus sonhos. Vocês são quem me inspira a todos os dias dar o melhor de mim, um obrigada nunca será suficiente.

À Susana Cunha por ter sido a melhor colega e amiga que me apoiou, que esteve lá em todas as aulas das 8 da manhã comigo e que me aturou estes 5 anos. As aulas sem o teu foco não teriam sido as mesmas.

Ao Miguel Fialho por me ter estado sempre à distância de uma chamada para me ajudar em tudo o que precisava ou apenas para me fazer companhia no caminho para casa.

À Caninha e Luisinha, por serem umas amigas especiais, que me ensinaram a descontrair e a aproveitar todos os momentos para dar uma boa gargalhada.

Ao Tiago, ao Daniel, e ao Afonso, que mesmo longe, sempre estiveram à distância de uma chamada para me apoiar em tudo.

À Professora Doutora Bárbara Rocha, pela inspiração, por todos os ensinamentos e pela amabilidade comigo partilhada nos últimos tempos.

À minha orientadora de estágio, Dra. Alexandra, e a toda a equipa técnica da Farmácia Bairro São Miguel, especialmente ao Sílvio, ao Tiago e ao André por me terem acolhido e por todos os conhecimentos transmitidos. E ao PP, o melhor colega de estágio, por me aturar todos os dias, pela companhia na hora do lanche e pelo tutorial de como tirar um café.

Aos Professores Carneiro, Roberto e Canelas por me inspirarem todos os dias e me terem ensinado que o rigor, a disciplina e o trabalho árduo é a chave para o sucesso.

À Catarina Contente, a minha presidente, uma amizade improvável que se tornou para a vida graças à nossa Cinha e ao nosso querido Elmet'assim.

Aos meus afilhados, Francisco, Margarida e Diogo que tornaram estes anos muito mais especiais e que me enchem o coração de orgulho.

Ao Fábio por todo o apoio e por toda a força que me deu quando eu mais precisei.

A Coimbra, a cidade dos estudantes, onde vivi os melhores anos da minha vida, não te digo adeus, porque te levo sempre comigo.

A todos, o meu sincero OBRIGADO!

Índice

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	8
1. Introdução	9
2. Farmácia Bairro São Miguel.....	9
3. Análise SWOT	10
3.1. Pontos Fortes.....	10
3.1.1. Equipa Técnica e Farmacêutica	10
3.1.2. Confiança e Autonomia	11
3.1.3. Grande dimensão e variedade de produtos	11
3.2. Pontos Fracos.....	11
3.2.1. Nome comercial e denominação comum internacional dos medicamentos	11
3.2.2. Insegurança no contacto com o público.....	11
3.3. Oportunidades	12
3.3.1. Interação com utentes com perfis farmacoterapêuticos diferentes	12
3.3.2. Formações.....	Error! Bookmark not defined.
3.3.3. Desenvolvimento dos conhecimentos na área do marketing farmacêutico	12
3.4. Ameaças	13
3.4.1. Medicamentos esgotados ou rateados	13
3.4.2. Locais de venda de MNSRM e suplementos alimentares.....	13
4. Casos Práticos.....	14
4.1. Caso Prático 1: Infecção Urinária	14
4.2. Caso Prático 2: Crise Alérgica.....	15
4.3. Caso Prático 3: Tosse com Expetoração.....	15
4.4. Caso Prático 4: Doença Hemorroidária.....	16
4.5. Caso Prático 5: Obstipação	17
5. Considerações Finais.....	18
Referências Bibliográficas	19

Parte II – Relatório de Estágio em Investigação

List of Abbreviations	22
Abstract.....	23
1. Introduction.....	24
2. Methods.....	26
3. Results.....	28
4. Discussion.....	30
5. Análise SWOT	31
5.1. Pontos Fortes.....	32
5.1.1. Aprendizagem e aperfeiçoamento da prática laboratorial.....	32
5.1.2. Desenvolvimento da capacidade analítica e interpretação de resultado.....	32
5.2. Pontos Fracos.....	32
5.2.1. Inexperiência com algumas metodologias.....	32

5.3. Oportunidades	33
5.3.1. Contacto com diferentes projetos de investigação	33
5.3.2. Co-investigadora num projeto de investigação.....	33
5.4. Ameaças	33
5.4.1. Falta de meios para realizar o trabalho experimental.....	33
Referências Bibliográficas	35

Parte III – Monografia: “A Influência do Microbiota Intestinal e Transplante de Fezes no tratamento do Cancro Colorretal”

Lista de abreviaturas	37
Resumo	38
Abstract.....	39
1. Introdução	40
2. Microbiota Intestinal	40
2.1. Composição da Microbiota Intestinal.....	41
2.2. Funções Fisiológicas	41
2.3. Fatores que Influenciam a Composição	44
2.3.1. Dieta e Estilo de Vida	44
2.3.2. Antibióticos.....	45
2.3.3. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos.....	45
3. Cancro Colorretal.....	46
3.1. Fisiologia e Epidemiologia.....	46
3.2. A Microbiota Intestinal em doentes com Cancro Colorretal	47
3.3. Efeito da Microbiota Intestinal na efetividade da Quimioterapia, Radioterapia e Imunoterapia	48
3.3.1. Quimioterapia e Radioterapia	48
3.3.2. Imunoterapia	49
4. Transplante fecal.....	51
4.1. Definição	51
4.2. Preparação e Procedimento.....	52
4.3. Indicações e Efeitos Secundários	53
4.4. Vantagens e Desvantagens	53
4.5. Potencial do Transplante Fecal no tratamento do Cancro Colorretal.....	54
5. Perspetivas Futuras do Transplante da Microbiota Intestinal	55
6. Considerações Finais.....	57
Referências Bibliográficas	58

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Bairro São Miguel

Sob orientação da Dra. Alexandra Albuquerque

Lista de Abreviaturas

ANF – Associação Nacional de Farmácias

DCI – Denominação Internacional Comum

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FOS – Fruto-oligossacarídeos

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MNSRM-EF – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de Venda Exclusiva em Farmácia

PCHC – Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal

SIFARMA2000[®] – Sistema Informático disponibilizado pela Glintt[®]

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), foi elaborado para proporcionar a melhor formação académica e, por isso, para além da componente teórica engloba uma componente prática de forma a aplicar conhecimentos, consolidar os mesmos, mas também a ter contacto com os utentes e com as reais necessidades dos mesmos.¹

O farmacêutico além de ser considerado o especialista do medicamento é também um agente de saúde pública atuando no aconselhamento e apoio de doentes, na prevenção, deteção, intervenção e gestão de doenças a longo prazo, desempenha também uma função essencial na adesão à terapêutica.^{2,3}

Cada vez mais a Farmácia Comunitária é o primeiro local onde as pessoas se dirigem para pedir um aconselhamento, isto deve-se à confiança que os utentes têm no farmacêutico, comprovando a sua importância na sociedade e na manutenção da saúde da população.²

Este relatório refere-se ao estágio que decorreu na Farmácia Bairro São Miguel, no período de 9 de janeiro a 24 de abril de 2023, sob orientação da Dra. Alexandra Albuquerque, cujo objetivo é transmitir a experiência no decurso do mesmo.

2. Farmácia Bairro São Miguel

A Farmácia Bairro São Miguel iniciou a sua atividade em 2008 conta atualmente com 15 anos ao serviço da comunidade. A equipa é constituída por farmacêuticos e técnicos de farmácia.

A Farmácia é constituída por uma zona de atendimentos que é composta por 4 balcões de atendimento, ao longo de toda esta área encontra-se a área de exposição de diversos medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), medicamentos não sujeitos a receita médica de venda exclusiva em farmácia (MNSRM-EF) e suplementos alimentares. Todos os produtos encontram-se organizados por indicação terapêutica. Na restante área disponível para os utentes encontra-se uma área onde estão expostos uma panóplia de produtos organizados por marcas, como por exemplo produtos cosméticos e de higiene corporal (PCHC). Nesta zona da farmácia encontra-se também um gabinete reservado para a prestação de serviços farmacêuticos como determinação de alguns parâmetros bioquímicos ou a administração de vacinas ou injetáveis. O *backoffice* é constituído por uma região de receção

e arrumação de encomendas, um armazém, um laboratório, um gabinete destinado a consultas, um escritório, uma cozinha, uma zona de descanso e uma casa de banho.

A Farmácia Bairro São Miguel está associada à Associação Nacional de Farmácias (ANF) e utiliza o Sistema Informático disponibilizado pela Glint® (SIFARMA2000®).

3. Análise SWOT

O presente relatório de estágio foi desenvolvido segundo uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities e Threats*), realçando os pontos fortes e promover o alcance de soluções para os pontos fracos que avaliam uma dimensão interna. Por outro lado, e de um ponto de vista externo refletir sobre as oportunidades e fraquezas que foram surgindo ao longo do estágio curricular (**Figura I**).⁴

<p>Pontos Fortes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Equipa técnica e farmacêutica • Confiança e autonomia • Grande dimensão e variedade de produtos 	<p>Pontos Fracos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nome comercial e denominação comum internacional dos medicamentos • Insegurança no contacto com o público
<p>Oportunidades</p> <ul style="list-style-type: none"> • Interação com utentes com perfis farmacoterapêuticos diferentes • Ações de formação • Desenvolvimento dos conhecimentos na área do marketing farmacêutico 	<p>Ameaças</p> <ul style="list-style-type: none"> • Medicamentos esgotados ou rateados • Locais de venda de MNSRM

Figura I- Quadro resumo da Análise SWOT.

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Equipa Técnica e Farmacêutica

Um dos pontos que mais contribuiu para o sucesso do estágio foi a excelente equipa técnica e farmacêutica que me acompanhou na Farmácia Bairro São Miguel. É uma equipa unida, profissional, bastante acolhedora e disponível tanto para o apoio aos estagiários como ao acompanhamento dos utentes. É também de realçar a entreatajuda entre todos e a grande disponibilidade para o esclarecimento de qualquer dúvida.

3.1.2. Confiança e autonomia

Toda a equipa deposita grande confiança nos estagiários e após o acompanhamento das tarefas diárias, desde a receção da encomenda, arrumação e atendimento existe liberdade para a realização de outras tarefas, estando sempre disponíveis para o esclarecimento de qualquer dúvida. Para além da confiança, a autonomia foi fundamental para o sucesso do meu desenvolvimento profissional, pois para além de fazer o trabalho presente no Plano de Estágio, foi possível tomar iniciativa e contribuir para o bom funcionamento da farmácia.

3.1.3. Grande dimensão e variedade de produtos

Tendo a farmácia uma localização que abrange distintas faixas etárias de utentes é fundamental ter resposta para as diferentes necessidades dos mesmos. Como tal, um ponto forte da Farmácia é a sua dimensão que garante uma grande variedade de produtos. Essa diversidade abrange desde medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), MNSRM, MNSRM-EF, bem como suplementos alimentares e PCHC. O contacto com uma ampla gama de produtos permite uma maior familiaridade com diferentes marcas, formulações e apresentações, isso proporciona a oportunidade de expandir o meu conhecimento.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Nome comercial e denominação comum internacional dos medicamentos

A partir de junho de 2012 foi instituída a prescrição e dispensa de medicamentos por Denominação Internacional Comum (DCI).⁵ Esta medida permite ao utente ter liberdade de escolha entre o medicamento original ou o medicamento genérico, tendo sempre em consideração o mesmo princípio ativo, a mesma forma farmacêutica e a mesma dosagem.

Durante o atendimento deparei-me muitas vezes com os utentes a fazerem pedidos pelo nome comercial o que acrescentou um obstáculo ao meu trabalho, pois tinha alguma dificuldade em associar o nome comercial ao princípio ativo. Esta dificuldade inicialmente foi colmatada com o auxílio de toda a equipa da farmácia, mas devido à receção de medicamentos o conhecimento foi aumentando e a segurança no momento do atendimento aumentou.

3.2.2. Insegurança no contacto com o público

Como estagiária a iniciar o contacto com os utentes os primeiros tempos acarretavam sempre algum nervosismo no atendimento ao público, quando pediam o meu aconselhamento ou algum esclarecimento adicional, não por falta de conhecimentos, mas muitas vezes por falta

de prática na partilha de conhecimentos. Com a ajuda de toda a equipa tanto por observação dos mesmos como por algumas explicações e com a prática a insegurança foi diminuindo.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Interação com utentes com perfis farmacoterapêuticos diferentes

Em consequência do elevado número de atendimentos existe a possibilidade de colocar em prática diferentes conhecimentos adquiridos durante os 5 anos de curso, para responder a diferentes dúvidas e necessidades dos utentes. Devido à presença de utentes fidelizados onde a sua visita à farmácia é recorrente conseguimos fazer o seguimento farmacoterapêutico, bem como avaliar a adesão à terapêutica, interações medicamentosas, aparecimento de efeitos adversos, ineficácia terapêutica e a toma correta da medicação.

3.3.2. Formações

Um dos deveres do farmacêutico passa por atualizar frequentemente os seus conhecimentos para garantir a melhor prestação de serviço aos utentes,³ para tal uma das ferramentas é frequentar formações. Durante o meu período de estágio tive o prazer de participar em diversas formações que ajudaram a esclarecer algumas dúvidas e a fortalecer o meu conhecimento em diversas áreas, o que promoveu posteriormente um melhor aconselhamento ao doente.

De entre as formações que assisti destaco: Pharma nord (suplementos alimentares), Reckitt (MNSRM), Zambon (MNSRM) e Frontline (Medicamento de uso veterinário).

3.3.3. Desenvolvimento dos conhecimentos na área do marketing farmacêutico

A dinamização da Farmácia Bairro São Miguel é realizada a vários níveis, sendo um deles na página de *Facebook* em constante atualização, que tem como intuito expor campanhas promocionais em vigor, publicações de carácter científico, e também publicações de carácter informativo. Durante o estágio tive a oportunidade de dar o meu contributo para algumas publicações feitas na página da farmácia, o que promoveu o meu desenvolvimento na área de marketing digital.

Por outro lado, é fundamental a dinamização do espaço físico da farmácia, visto que uma parte da população que servimos é uma população envelhecida, tendo sempre por base a rotação de produtos de maior interesse para o público, bem como ter em conta a sazonalidade dos mesmos. Esta dinamização física também contribuiu para colocar em prática

conhecimentos de marketing farmacêutico adquiridos ao longo do curso, apostando nas zonas quentes da farmácia para colocar produtos de destaque, tendo em conta mudanças sazonais, escoamento de produto, pois o posicionamento dos mesmo está relacionado com o número de vendas.

3.4. Ameaças

3.4.1. Medicamentos esgotados ou rateados

Uma grande ameaça que me deparei ao longo do estágio foram os medicamentos esgotados ou rateados necessários para a continuidade da terapêutica de doentes com doenças crónicas. Esta situação é um risco para a saúde e qualidade de vida dos doentes, porque alguns medicamentos esgotados não têm um medicamento equivalente o que faz com que o doente tenha de se dirigir novamente ao médico para haver uma revisão da terapêutica. Noutros casos, existe a possibilidade de substituir por um medicamento genérico, mas nem sempre é bem aceite, porque o utente tem sempre alguns receios à mudança, receio de ineficácia ou de aparecimento de efeitos secundários.

Por consequência, a insatisfação dos utentes era notória e acabava por prejudicar a continuidade da terapêutica, dificultar o atendimento e a sua relação de fidelidade para com a farmácia.

Para colmatar este problema, foi criada com o meu auxílio uma tabela com os medicamentos esgotados, com o objetivo de ao longo do dia facilitar a tentativa de encomenda dos mesmos e, assim, garantir que a farmácia tivesse em stock os medicamentos necessários para fazer face às necessidades dos utentes.

3.4.2. Locais de venda de MNSRM e suplementos alimentares

Os locais de vendas de MNSRM e suplementos alimentares em plataformas online e em outros pontos de venda que não sejam a farmácia são uma das grandes ameaças à farmácia, tanto do ponto de vista económico como de saúde pública.

Em primeiro lugar, muitos locais de venda de MNSRM conseguem praticar preços mais baixos devido ao volume de vendas, preços que as farmácias não podem praticar, o que leva alguns utentes a optarem por esses espaços onde não é feito um correto aconselhamento. Mesmo sendo medicamentos de venda livre têm efeitos secundários e contraindicações, portanto o seu uso deve ser feito de forma consciente e racional, tendo sempre em consideração as patologias do doente, as possíveis interações e efeitos adversos.

Para colmatar esta situação, as farmácias para além de um correto aconselhamento tendo sempre em conta alguma patologia que o utente tenha, também aderiram ao plano do Cartão Saúde, que potencia a fidelização dos utentes à farmácia e como tal ajuda a combater esta ameaça.

4. Casos Práticos

4.1. Caso Prático I: Infecção Urinária

Utente do sexo feminino, na casa dos 30 anos, desloca-se à farmácia com queixas de desconforto urinário, sensação de peso na bexiga e ardor no momento da micção. Refere ainda que os sintomas iniciaram no dia anterior e realçou também a necessidade urgente de urinar. O relato da utente levanta suspeitas de infecção urinária.

A infecção urinária é uma infecção bacteriana muito comum na comunidade, mas é mais prevalente nas mulheres devido ao menor comprimento da uretra feminina e proximidade do meato urinário desta à vagina e ânus.⁶ Questionei a senhora se para além dos sintomas relatados se tinha hematúria ou febre, se tinha alergia a algum princípio ativo, alguma doença ou se tomava anticoagulantes, ao que ela me respondeu negativamente.

Uma vez que possivelmente se tratava de uma infecção urinária em estado inicial recomendei a toma de suplemento alimentar Cistisil[®]. Este produto é um suplemento alimentar que tem na sua constituição arando vermelho (*Vaccinium macrocarpon*), que inibe a aderência bacteriana devido às proantocianidinas, cavalinha (*Equisetum arvense*) e uva-ursina (*Arctostaphylos uva-ursi*) com propriedades diuréticas, que favorecem principalmente a eliminação de água, logo ajudam na eliminação dos patogénios. Tem também na sua constituição fruto-oligossacarídeos (FOS), prebióticos que promovem o equilíbrio da microbiota.

Recomendei à utente a toma de 1 comprimido de 12 em 12 horas durante os primeiros 10 dias e, depois, 1 comprimido por dia por mais 10 dias.⁷ Aconselhei que se deslocasse ao médico caso os sintomas se agravassem ou na ausência de melhoria no prazo de alguns dias. Para além da recomendação farmacológica, referi as recomendações não farmacológicas que deveria ter em conta como aumentar o consumo de água (no mínimo 2 litros), evitar o uso de pensos diários e de roupa interior justa ou sintética e não retardar a micção.

4.2. Caso Prático 2: Crise Alérgica

Utente do sexo masculino, na casa dos 30 anos, desloca-se à farmácia com sintomas de conjuntivite alérgica, realçando a comichão ocular, vermelhidão e lacrimejamento. Questionei se tinha alguma dor ou se notava alguma secreção anormal no olho de cor amarela, ao que me respondeu negativamente, logo torna-se menos provável a hipótese de conjuntivite bacteriana. Para além disso, questionei se era habitual ter alergias sazonais, ao que respondeu que sim, nem sempre com as mesmas manifestações clínicas.

Posteriormente, perguntei se tinha outros sintomas como espirros, tosse, dificuldade em respirar, se tinha alergia a algum princípio ativo, se tem glaucoma ou se toma anticoagulantes ao que me respondeu que só tinha os sintomas descritos anteriormente e mais nenhum problema de saúde. Uma vez que possivelmente se trata de uma conjuntivite ocular alérgica, indiquei a utilização de Zabak[®] na posologia de 1 gota em cada olho 2 vezes por dia (de manhã e à noite).⁸ Zabak[®] tem como princípio ativo cetotifeno que é um agente antialérgico. Recomendei que se deslocasse ao médico caso os sintomas se agravassem ou na ausência de melhoria no prazo de alguns dias.

Como medidas não farmacológicas recomendei que evitasse a exposição de alérgenos, também evitar abrir as janelas de casa durante as horas de maior concentração de alérgenos no ar, lavar bem o rosto e evitar o contacto das mãos com os olhos.

4.3. Caso Prático 3: Tosse com Expetoração

Um utente desloca-se à farmácia com o objetivo de lhe ser aconselhado um medicamento para a tosse com expetoração da filha que tem 17 anos. Inicialmente, questionei ao utente à quanto tempo a tosse teve início, ao que me respondeu que tinha sido à 2 dias, e que a filha não tem problemas de saúde conhecidos, alergias a princípios ativos e que não toma nenhuma medicação.

Ao longo do estágio apercebi-me que muitas pessoas confundem a tosse seca com a tosse com expetoração, e como a pessoa a quem se destinava o aconselhamento não se encontrava fisicamente optei por aconselhar um xarope que dá para os dois tipos de tosse, o GrinTuss Adulto[®], este é um dispositivo médico, visto que, o seu principal mecanismo é físico/barreira, pois forma uma película protetora que adere à mucosa protegendo-a do contacto com agentes irritantes e reduz também a fricção a nível da faringe, tem também uma ação muco-reguladora. Tem na sua constituição mel, complexos moleculares de resinas, polissacáridos, saponinas e

flavonóides de Grindélia (ação expetorante e calmante da tosse) e Tanchagem (*Plantago lanceolata*) e Helicrisum (*Helichrysum italicum* var. *HyperCreso*).

Recomendei a toma de 10 mL de xarope 2 a 4 vezes por dia, sendo que a última toma do dia deve ser antes de dormir.⁹ Relembrei para a ingestão de água ao longo do dia para ajudar a soltar a expetoração. Alertei também para estar atenta ao aparecimento de sinais de alerta como tosse com sangue, falta de ar, febre ou agravamento dos sintomas dentro de 5 dias devia consultar o médico.

4.4. Caso Prático 4: Doença Hemorroidária

Utente do sexo feminino, na casa dos 50 anos, desloca-se à farmácia com sintomas de dor e prurido anal, solicitando algo que aliviasse a sua crise hemorroidária. Após perceber que se tratava de uma situação de hemorroidas externas e que não era a primeira vez que a doente tinha uma crise iniciei o atendimento por explicar algumas medidas higieno-dietéticas como diminuir o consumo de álcool, especiarias e café (irritantes para a mucosa), após cada ato defecatório a região anorretal deve ser bem lavada com água e sabão e seca com compressas ou toalhetes higiénicos, fazer banho de “assento” em água tépida durante 10 a 15 minutos, 2 a 3 vezes por dia (promove o relaxamento do espasmo muscular anal) e nas crises agudas fazer a lavagem com água fria que tem efeito vasoconstritor ou aplicação de gelo.

Em seguida, questionei se tinha alergia a algum princípio ativo, ao que me respondeu negativamente. Seguidamente, recomendei a aplicação do creme retal Procto-Glyvenol[®] de manhã e à noite após uma higienização correta da região retal, até alívio dos sintomas.¹⁰ Este creme tem como substância ativa tribenosido, que tem propriedades anti-inflamatórias e melhora o tónus vascular, tem também cloridrato de lidocaína que permite o alívio sintomático da dor, ardor e desconforto anal.

Para além do creme retal, aconselhei a toma de Daflon[®] 1000 para o tratamento sintomático da crise hemorroidária, este medicamento é constituído por bioflavonóides que tem uma ação venotrópica, que diminuem a estase venosa e reforçam a resistência capilar. Neste caso, deve ser tomado 1 comprimido 3 vezes por dia durante 4 dias, posteriormente, 1 comprimido 2 vezes ao dia durante 3 dias e, por fim, fazer uma dose de manutenção de 1 comprimido por dia até ao fim da caixa.¹¹

Após o aconselhamento, questionei ainda a utente se apresenta obstipação ou esforço a defecar, ao qual me respondeu negativamente, pois muitas vezes a doença hemorroidária é

agravada quando existe esforço defecatório e obstipação e também recorrente na gravidez/pós-parto.

4.5. Caso Prático 5: Obstipação

Utente do sexo feminino na casa dos 60 anos desloca-se à farmácia com queixas de desconforto abdominal e de obstipação. Após perceber que na última semana a senhora teve menos de 3 evacuações conclui estar perante um caso de obstipação que se tratava de uma situação recorrente e, para além disso a senhora apresentar muitas vezes dificuldades na defecação.

Iniciei o meu atendimento por explicar algumas medidas não farmacológicas, por exemplo aumento da ingestão de água e do consumo da quantidade de fibras, reeducar o intestino (à mesma hora, sem pressa, após a refeição), não ignorar o reflexo de defecação e praticar exercício físico.

Após perceber que a obstipação não se devia ao efeito secundário de nenhum medicamento e que a senhora precisava urgentemente da resolução do seu problema, aconselhei o Microlax[®], que tem na sua composição citrato de sódio e laurilsufoacetato de sódio, que aumentam a secreção de água e eletrólitos da mucosa intestinal tornando as fezes com uma textura mais mole.¹² Como se apresenta na forma farmacêutica de enema demora cerca de 15 a 30 minutos a exercer o seu efeito, e por isso estão indicados em situações que se pretende evacuar. Alertei para o facto de provocar uma dor leve, à qual se sente a necessidade de evacuar, soltando as fezes secas que provoca a defecação.

Como se trata de uma obstipação crónica para além de resolver a situação aguda, também é fundamental um tratamento a longo prazo e, para tal, recomendei o Dulcosoft[®] solução oral. É um dispositivo médico, que tem como princípio ativo o Macrogol 4000, polímero linear longo que retêm moléculas de água através de pontes de hidrogénio. Quando administrado produz um aumento do volume de fluidos intestinais, o que leva a um movimento intestinal facilitando o movimento das fezes. Recomendei a toma de 20 mL por dia¹³ e alertei que é fundamental uma hidratação adequada durante o tratamento.

5. Considerações Finais

Após a realização do meu estágio pude constatar que o farmacêutico é uma pessoa em quem os utentes confiam para esclarecer todas as suas dúvidas, é o primeiro elo de contacto entre o cidadão e o sistema de saúde, responsáveis por garantir a saúde e bem-estar da população, mas também o último elo de ligação, que para além da dispensa correta dos medicamentos prescritos, tem como missão um correto aconselhamento e esclarecimento adicional.

Durante os 5 anos de formação adquiri conhecimentos que pude pôr em prática no exercício desta profissão e também garantir a consolidação dos mesmos. Desta forma, o estágio conferiu-me conhecimentos práticos únicos, bem como o meu desenvolvimento a nível pessoal e profissional imprescindível para o meu futuro enquanto farmacêutica.

De realçar que, para além de todos os conhecimentos adquiridos durante o estágio desenvolvi a capacidade de concentração e serenidade. Permitindo-me assim transmitir segurança à pessoa que tinha à minha frente, dando-lhe a atenção e despendendo do tempo necessário, mesmo nas horas com mais afluência na farmácia.

Termino este relatório enaltecendo toda a equipa da Farmácia Bairro São Miguel que me mostraram o papel fundamental do farmacêutico na sociedade, valorizando o seu profissionalismo, compreensão, apoio e partilha de conhecimentos. A vida de um farmacêutico deve ser em constante atualização e formação e considero que este foi o primeiro passo como profissional que enfrentei nesta área.

Referências Bibliográficas

1. **Estágio Curricular - Unidade Curricular - Universidade de Coimbra** - [Consult. 1 jun. 2023]. Disponível em: https://apps.uc.pt/courses/PT/unit/86966/20001/2020-%202021?common%20_core=true&t%20ype=ram&id=1172
2. **Ordem dos Farmacêuticos** - [Consult. 1 jun. 2023]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/>
3. **ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. [Consult. 9 abril 2023]. Disponível em: https://ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/0014300159_469595878620679aa0a805.pdf
4. GÜREL, Emet - SWOT ANALYSIS: A THEORETICAL REVIEW. **Journal of International Social Research**. ISSN 1307-9581. 10:51 (2017) 994–1006. doi: 10.17719/jisr.2017.1832.
5. ASSEMBLEIA DA REPÚBLICA - **Lei n. o 11/2012, de 8 de março**. [Consult. 4 março 2023]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/542271>
6. AYDIN, Abdullatif *et al.* - Recurrent urinary tract infections in women. **International Urogynecology Journal**. . ISSN 14333023. 26:6 (2015) 795–804. doi: 10.1007/s00192-014-2569-5.
7. **CISTISIL: Silfarmaplus** - [Consult. 1 jun. 2023]. Disponível em: <https://silfarmaplus.pt/produto/cistisil/>
8. INFARMED, I. P. – **Zabak 0,25mg/ml, colírio, solução - Resumo das Características do Medicamento**. [Consult. 15 abril 2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/index.xhtml>.
9. **Grintuss Xarope Adulto | Aboca** - [Consult. 1 jun. 2023]. Disponível em: <https://www.grintuss.pt/grintuss/grintuss-adult-xarope/>
10. INFARMED, I. P. - **Procto-Glyvenol 50 mg/g + 20 mg/g, Creme rectal - Resumo das Características do Medicamento**. [Consult. 15 abril 2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/index.xhtml>.

11. INFARMED, I. P. - **Daflon 1000, 1000 mg comprimido revestido por película - Resumo das Características do Medicamento.** [Consult. 15 abril 2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/index.xhtml>.

12. INFARMED, I. P. – **Microlax, 450 mg/5ml + 45mg/5ml, Solução retal - Resumo das Características do Medicamento.** [Consult. 15 abril 2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/index.xhtml>.

13. **Dulcosoft® Solução oral | Dulco** - [Consult. 1 jun. 2023]. Disponível em: https://www.dulcolax.com/pt-pt/todos-os-produtos/dulcosoft-solucao-oral?gclid=Cj%20KCQjw6cKiBhD5ARIsAKXUdyb-IEWxz3RUH5vR9gymSghMxVPdU0oRw3XGkffO%20eBrOGaBqhMBNi9laAgMYEALw_wcB&gclsrc=aw.ds

Parte II

Relatório de Estágio em Investigação

“The impact of antiseptic mouthwash in the composition and functional capacity of the oral microbiota”

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Sob orientação da Professora Doutora Bárbara Rocha

List of Abbreviations

CHX – Chlorhexidine

CNC – Center for Neuroscience and Cell Biology

FFUC – Faculty of Pharmacy of University of Coimbra

Abstract

The oral microbiota, comprises a diverse set of microorganisms in the oral cavity, that plays a crucial role in maintaining the body's balance and health. Factors such as diet, oral hygiene, age, health, and drugs influence the composition of the oral microbiota, where beneficial and pathogenic bacteria coexist in a delicate balance.

Chlorhexidine (CHX) at 0.2% concentration is widely used as an antimicrobial agent in oral mouthwash, impacting important mechanisms in the oral microbiota, such as the nitrate-nitrite- nitric oxide pathway. This study aims to explore how 0.2% CHX mouthwash affects this pathway and its effect on the nitrate reductase activity of oral bacteria and its potential impact on blood pressure in volunteers without hypertension history.

The participants were randomly distributed in 2 groups for a 7-day intervention, during which they were asked to rinse their mouths for 1 minute with either 10 mL 0.2% CHX or 10 mL placebo (tap water) twice a day.

Regarding blood pressure, a slight increase was observed in the group that used CHX (with no statistical significance). Regarding the concentration of salivary nitrite, in the group who used CHX mouthwash for 7 days, after rinsing with placebo there was a decrease ($19.3 \pm 6.9 \mu\text{M}$ vs $7.4 \pm 1.7 \mu\text{M}$, $p=0.043$). In relation to the fold increase of salivary nitrite after volunteers rinsed their mouths with beet root juice for 5 minutes in comparison with water, the increase of salivary nitrite was significantly lower in the group that used antiseptic mouthwash ($p=0.0104$).

This data suggests that the use of 0.2% CHX twice a day has an influence on nitrate reductase activity, but more studies are mandatory to better ascertain its impact on blood pressure and on the oral microbiota composition.

Keywords: Chlorhexidine, Oral microbiota, Nitrate

I. Introduction

The oral microbiota is the term used to define the diverse set of microorganisms that inhabit the oral cavity, including the surface of teeth, gums, tongue, palate, and buccal mucosa. This microbial community is complex and plays a crucial role in the health and maintenance of the human body's balance.¹

The composition of the oral microbiota is influenced by various factors, such as diet, oral hygiene, age, health, and drugs. Among the microorganisms present in the mouth, bacteria, fungi, and viruses coexist in a delicate balance.^{1,2}

Oral bacteria are the main components of the oral microbiota and can be classified into various groups, including beneficial, and pathogenic bacteria. Some beneficial bacteria assist in protecting against the colonization of harmful microorganisms, while others are involved in the degradation of food remnants, aiding in digestion. However, certain pathogenic bacteria may contribute to the development of oral diseases such as periodontal disease, and bad breath.¹

Chlorhexidine (CHX) at a concentration of 0.2% is one of the most commonly used antimicrobial agents in oral mouthwash, even when there is no oral disease present, to reduce the bacterial load in the oral cavity.³

Chlorhexidine can affect important mechanisms performed by the bacteria present in the oral microbiota, such as the nitrate- nitrite- nitric oxide pathway.⁴

This pathway, which comprises the enterosalivary circulation of nitrate, begins with the ingestion of nitrate in the diet, found in foods like leafy greens and beetroot. Nitrate is reduced to nitrite by oral bacteria, that express, nitrate reductase enzymes. Nitrite is then further reduced to nitric oxide (NO) in the stomach, making this cycle fundamental for maintaining NO homeostasis (**Figure 1**).⁴

Nitric oxide is an essential signaling molecule that plays various roles, including regulation of vascular tone, modulation of the immune system, neurotransmission, and blood pressure regulation.⁵

The nitrite formed in the oral cavity is quickly absorbed and, in the stomach, due to its acidic pH, is protonated, generating NO . The remaining nitrite proceeds to the gut, where it may serve as an energy source for bacteria in the gut microbiota. Some of this nitrite is reabsorbed into the bloodstream and returns to the oral cavity, while the rest is eliminated

through urine. This cycle ensures a delicate balance of nitrogen species in the body and highlights the intricate interactions between the oral microbiota, diet, and overall health.⁵

The present study aims to investigate how the disruption of the oral microbiota, using mouthwash with 0.2% CHX, affects the nitrate-nitrite- $\cdot\text{NO}$ pathway. Specifically, we aim to understand its effect on the nitrate reductase activity of oral bacteria and its impact on blood pressure in volunteers with no known history of hypertension.

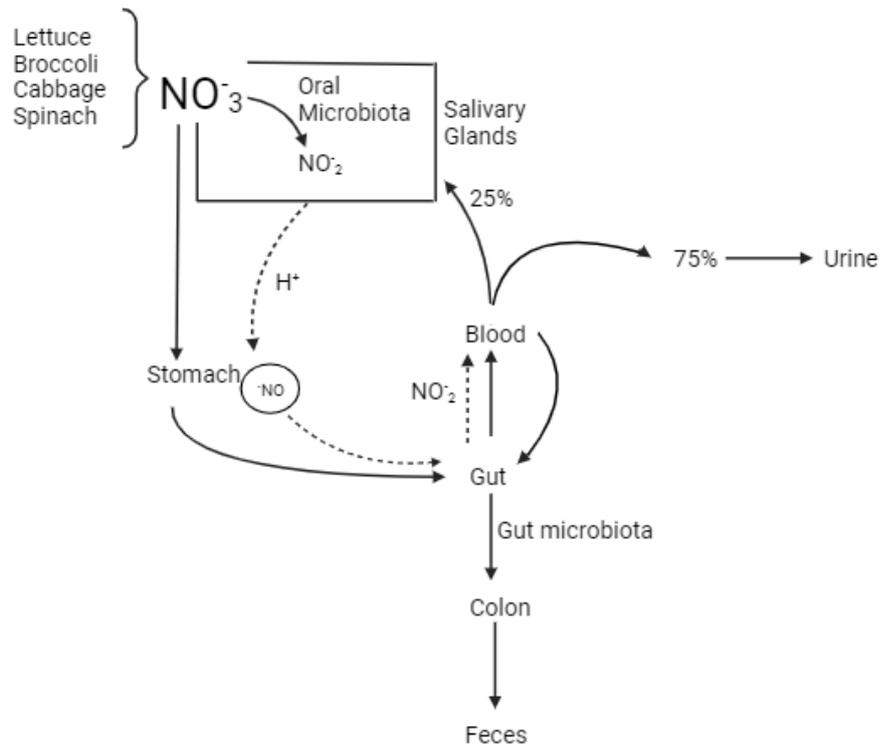


Figure 1. Nitrate- nitrite- nitric oxide pathway.

2. Methods

Human subjects

Healthy human volunteers, aged 20-45, were invited to participate in the study. Students and staff from the School of Pharmacy (University of Coimbra) were recruited at the campus and gave their informed consent to be enrolled in the study. All procedures were approved by the Ethics Committee at the Faculty of Medicine of University of Coimbra. The exclusion criteria for this study were: 1) use of antiseptic mouthwash in the previous month, 2) consumption of antibiotics in the last 3 months, 3) vegetarian diet (high nitrate content), 4) periodontal disease, 5) hypertension and 6) pregnancy. From the participants who agreed to participate in the study, two were excluded (**Figure 2**).

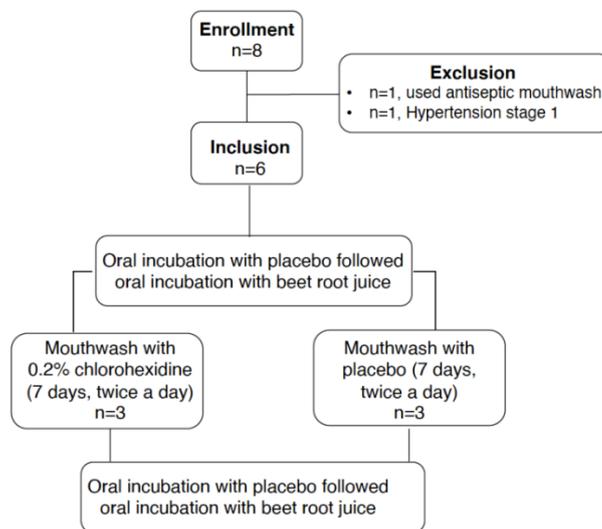


Figure 2. Participant chart flow.

Experimental design

Each participant completed two visits to the School of Pharmacy, with two of them completing an additional two visits. In the first visit (D0), the exclusion criteria were confirmed, and each volunteer was weighed and blood pressure was measured. The anthropometrical information collected is shown in **Table I**. Saliva was collected to determine the nitrate reductase activity of the oral microbiota.

Then, participants were randomly distributed in two groups. During a 7-day intervention, participants rinsed their mouths for 1 minute with either 10 mL 0.2% chlorhexidine (Parodontax, Colutório Extra) or 10 mL tap water (control) twice a day. They returned to the study unit (D7) where blood pressure was again measured and the nitrate reductase activity of the oral microbiota was measured.

Fourteen days (D21) and twenty-one days (D28) after chlorhexidine mouthwash, two of the participants who rinsed their mouths for 1 minute with 10 mL 0.2% chlorhexidine returned to the study unit where the nitrate reductase activity of the oral microbiota was measured.

Table 1. Anthropometrical information (collected in the first visit).

Characteristics	
Age (years)	32.2±11.4 ^a
Gender (male:female)	3:3
Body mass index (Kg/m²)	24.0±3.0 ^a
Diastolic blood pressure (mmHg)	67.8±6.6 ^a
Systolic blood pressure (mmHg)	110.3±10.7 ^a
Mean arterial blood pressure (mmHg)	89.1±7.0 ^a

^a Results are expressed as mean ± standard deviation.

Blood pressure

Participants were allowed to rest for 30 minutes and three consecutive readings were performed using a validated digital blood pressure monitor (Omron M3 Comfort, OMRON Healthcare, USA). The readings were averaged to determine the mean blood pressure.

Nitrate reducing capacity of the oral microbiota

Volunteers were instructed to avoid the consumption of high nitrate foods (spinach, lettuce, broccoli, beetroot, radish) the day prior to their visit. Participants were then asked to hold 10 ml of placebo (unflavored water) in their mouths for 5 minutes. Samples were collected to 10 mL tubes. Then, the volunteers were asked to hold 10 mL of beet root juice (Beet it Sport, James White Drinks, UK) containing 92 µmol nitrate for 5 minutes. All samples were collected to 10 mL tubes and centrifuged (12000 rpm, 4°C) for 5 minutes. The supernatant was collected and nitrite concentration was determined in fresh samples by Griess method as previously reported.⁶ Of note, blank containing beet root juice was performed with the same dilution of the drink that was used in the experimental procedure. Spectra of beet root (blank), beet root after oral incubation and sodium nitrite 10 µM were performed to discard color interference at the wavelength of nitrite absorption (Shimadzu UV-Spectrophotometer UV-1800) (**Figure 3**).

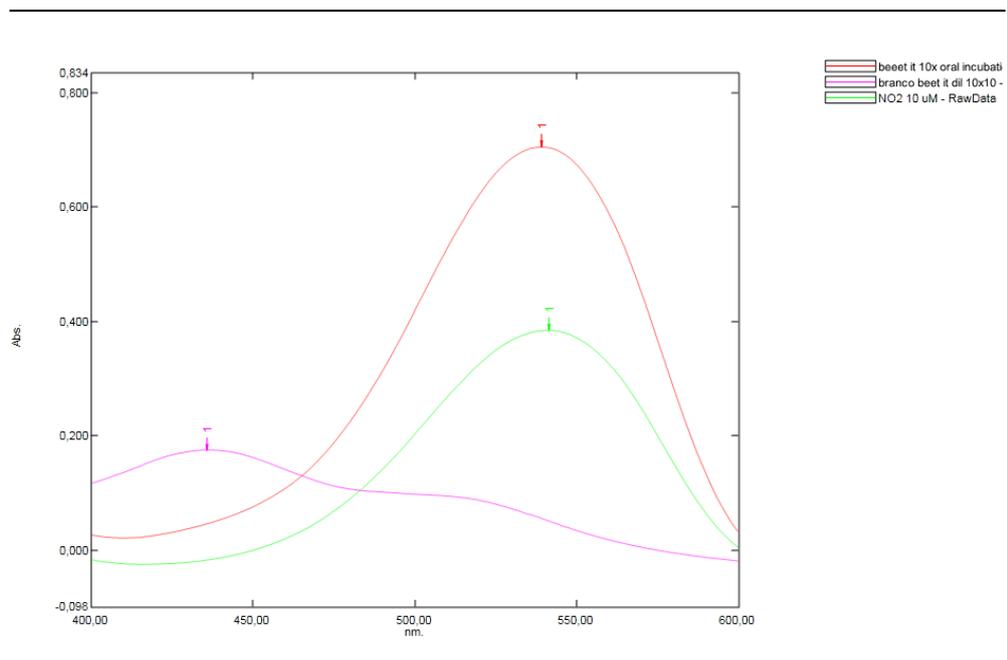


Figure 3- Spectra of beet root(blank), beet root after oral incubation and sodium nitrite 10 µM.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard deviation of the values in each group. In the present study, two experimental groups, each consisting of three subjects were used. For the statistical analysis, the comparison between the groups was performed using the Student t test, through the PRISMA software. The Student t test is commonly used for the comparison between two independent groups. A probability value (p) of less than 0.05 was considered significant.

3. Results

Blood pressure

In the control group there was a decrease in the mean blood pressure without statistical significance. In the group that used the chlorhexidine mouthwash, there was a decrease of mean blood pressure in one volunteer and an increase in the other two (**Figure 4**).

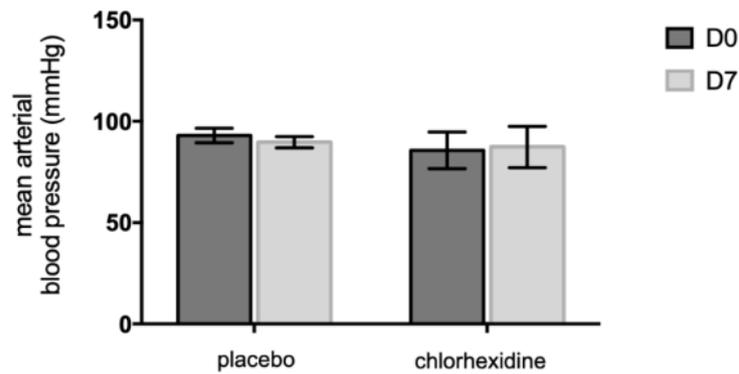


Figure 4 - Changes in mean blood pressure after 7 days of using placebo or chlorhexidine mouthwash. Values are presented as mean \pm SD.

Nitrate reducing capacity of the oral microbiota

The nitrate reducing capacity of the oral microbiota decreased in the group who used the chlorhexidine mouthwash with both placebo and nitrate (beet root juice). The concentration of salivary nitrite after rinsing with unflavored water (placebo) decreased from $19.3 \pm 6.9 \mu\text{M}$ before the intervention to $7.4 \pm 1.7 \mu\text{M}$ after rinsing with the mouthwash for 7 days ($p=0.043$). Fourteen days after D7 intervention the concentration of salivary nitrite after rinsing with unflavored water (placebo) decreased to $5.25 \pm 0.07 \mu\text{M}$, and after twenty-one days (D 28) the concentration increase to $13.8 \pm 4.8 \mu\text{M}$ (**Figure 5**).

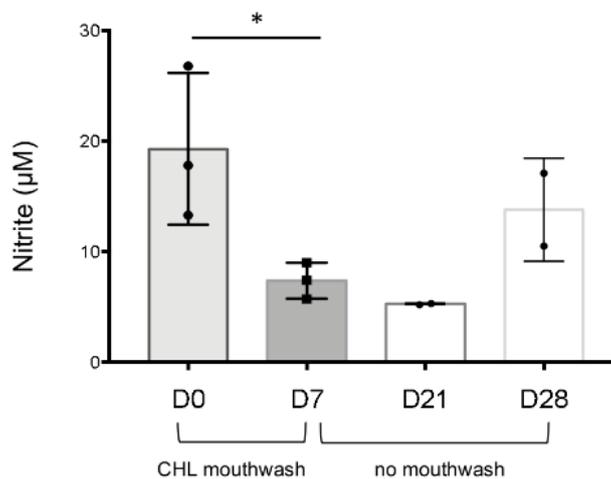


Figure 5 - Salivary nitrite before (D0) and after (D7) mouth washing with chlorhexidine for 7 days. And salivary nitrite fourteen days (D21) and twenty-one days (D28) after D7 intervention. Participants collected saliva after rinsing their mouths with 10 mL unflavored water (placebo) for 5 minutes. Nitrite concentration was determined by Griess method. Values are presented as mean \pm SD.

In the placebo group, at D7, there was a 4- to 6-fold increase of salivary nitrite after volunteers rinsed their mouths with beet root juice for 5 minutes in comparison with water. At D0 this increase was of 4-fold (**Figure 6**). In the group that used the anti-septic mouthwash the salivary concentration of nitrite at D0 increased 6- to 11-fold after volunteers rinsed their

mouths with beet root juice for 5 minutes ($164.9 \pm 12.5 \mu\text{M}$) in comparison with water ($19.3 \pm 6.9 \mu\text{M}$). However, after using the mouthwash for 7 days, nitrite salivary concentration was $7.4 \pm 1.7 \mu\text{M}$ after rising with water and, after rising with beet root was $9.6 \pm 4.6 \mu\text{M}$. The increase of salivary nitrite was significantly different in the group that used antiseptic mouthwash at D0 and D7 ($p=0.0104$) (**Figure 6**).

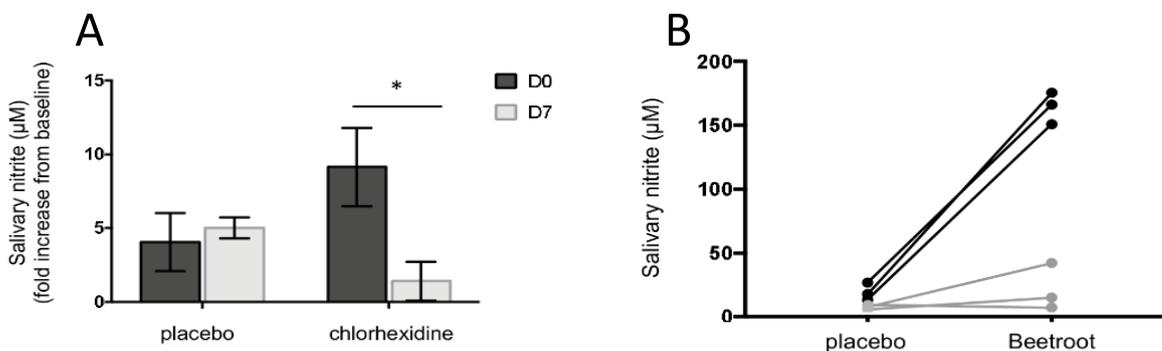


Figure 6- (A) Salivary nitrite concentration before (D0) and after (D7) mouth washing with placebo or chlorhexidine. Values represent the fold-increase of nitrite after volunteers rinsed their mouths with beet root juice in comparison to placebo (tap water). (B) Individual variation of salivary nitrite in the experimental group before (black lines) and after (gray lines) 7-day mouth washing with chlorhexidine upon rising their mouths with water and beet root juice.

4. Discussion

Chlorhexidine continues to be widely used and recommended by dentists for treatment of oral diseases. However, there is an urgent need for further studies to determine if the benefits of using mouthwash outweigh the harms to the oral microbiota, and what implications its use may have on oral and systemic diseases.

Regarding blood pressure, a slight increase was observed in the group that used chlorhexidine. To obtain more robust results, it would be necessary to increase the sample size and the study time, but the findings are consistent with expectations. The use of mouthwash containing chlorhexidine for 7 days likely leads to the destruction of a portion of the oral microbiota, compromising the nitrate-nitrite-nitric oxide cycle. As there is a decrease in NO production through this cycle, its effect on reducing blood pressure may be impaired.

After 7 days of mouthwash with chlorhexidine, there is a reduction in nitrate reductase activity probably due to the destruction of the oral microbiota. Two weeks after the end of the chlorhexidine mouthwash, the nitrite concentration after rising with 10 mL unflavored water for 5 minutes remains low, indicating that the oral microbiota has not yet recovered from the dysbiosis caused by chlorhexidine. However, after 3 weeks, nitrate reductase activity

returned to near baseline levels. It would be interesting to analyze the composition of the oral microbiota under these conditions in order to relate this functional alteration with the changes on the structure of specific bacterial communities.

We can conclude that the use of 0.2% chlorhexidine twice daily for 7 days has an influence on the function of the oral microbiota, and therefore, it affects the body's homeostasis. Although these effects are transitory and the oral microbiota recovers its diversity, it is crucial to conduct further studies to assess the long-term use of chlorhexidine mouthwashes and its impact on the oral microbiota, as well as on physiological functions related to the nitrate-nitrite-NO pathway.

5. Análise SWOT

O presente relatório de estágio foi desenvolvido segundo uma análise SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats), realçando os pontos fortes e promover o alcance de soluções para os pontos fracos que avaliam uma dimensão interna. Por outro lado, e de um ponto de vista externo refletir sobre as oportunidades e fraquezas que foram surgindo ao longo do estágio curricular (**Figura 7**).⁷

<p style="text-align: center;">Pontos Fortes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aprendizagem e aperfeiçoamento da prática laboratorial • Desenvolvimento da capacidade analítica e interpretação de resultados 	<p style="text-align: center;">Pontos Fracos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inexperiência com algumas metodologias
<p style="text-align: center;">Oportunidades</p> <ul style="list-style-type: none"> • Contacto com diferentes projetos de investigação • Co-investigadora num projeto de investigação 	<p style="text-align: center;">Ameaças</p> <ul style="list-style-type: none"> • Falta de meios para realizar o trabalho experimental

Figura 7- Quadro resumo da Análise SWOT.

5.1. Pontos Fortes

5.1.1. Aprendizagem e aperfeiçoamento da prática laboratorial

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de trabalhar com diferentes técnicas e metodologias, incluindo a quantificação do nitrito na saliva através do método de Griess. Essa experiência contribuiu para a expansão do meu conhecimento e das minhas habilidades práticas no âmbito laboratorial.

A orientação por profissionais experientes foi fundamental para o meu crescimento nesta área. Através do acompanhamento e ensinamentos, fui capaz de adquirir conhecimentos das técnicas laboratoriais, bem como compreender as bases teóricas subjacentes aos procedimentos realizados.

Posso afirmar, que no final do estágio adquiri competências sólidas no manuseio de equipamentos, execução de análises, interpretação de resultados e a confiança necessária para enfrentar desafios no ambiente de trabalho.

5.1.2. Desenvolvimento da capacidade analítica e interpretação de resultado

Durante o meu trabalho de investigação, fui exposta a uma vasta quantidade de dados que foi necessário tratar e interpretar. A habilidade de interpretar resultados tornou-se uma componente crucial, onde fui incentivada a compreender as implicações dos dados obtidos e a relacioná-los com os objetivos do projeto em que estava envolvida.

O desenvolvimento da minha capacidade analítica e interpretação de resultados desempenhou um papel fundamental no meu crescimento. Essa competência permitiu-me abordar os desafios com maior rigor crítico, contribuindo significativamente para a qualidade das conclusões do projeto em que participei.

5.2. Pontos Fracos

5.2.1. Inexperiência com algumas metodologias

A falta de experiência com algumas metodologias foi inicialmente um ponto fraco do meu estágio, pois comprometeu a minha autonomia no laboratório. Consequentemente, enfrentei algumas dificuldades em executar inicialmente algumas tarefas, tendo diversas vezes de recorrer ao auxílio da minha orientadora de estágio.

No entanto, considero que, no final do estágio, consegui adquirir as competências necessárias para a realização do trabalho proposto com sucesso.

5.3. Oportunidades

5.3.1. Contacto com diferentes projetos de investigação

Durante o meu estágio, tive o privilégio de ter contacto com diferentes projetos de investigação. Essa experiência proporcionou-me uma visão ampla e diversificada do grupo de trabalho em que estava inserida, permitindo-me explorar diversas abordagens científicas.

Ao colaborar com diferentes pessoas, pude aprender sobre tópicos variados e técnicas específicas utilizadas em cada projeto. Essa diversidade de projetos ampliou o meu horizonte científico e estimulou a minha curiosidade intelectual, ao mesmo tempo em que me desafiou a adaptar-me a novas dinâmicas e contextos de trabalho.

O contacto com os projetos também me ensinou a lidar com a incerteza e a complexidade inerentes à investigação científica. Através da resolução de problemas e da análise crítica de resultados, aprendi a enfrentar obstáculos de forma proativa e a abraçar os desafios como oportunidades de crescimento e aprendizagem.

5.3.2. Co-investigadora num projeto de investigação

Ao integrar a equipa de investigação, senti-me honrada pela oportunidade de contribuir ativamente para a produção de conhecimento e avanços científicos.

Como co-investigadora, participei em várias fases do projeto, desde o planeamento e desenho dos ensaios até à recolha e análise de dados. Essa experiência permitiu-me desenvolver habilidades fundamentais em metodologias de investigação.

Ao longo do projeto, enfrentei desafios e obstáculos que me incentivaram a ser mais resiliente e a encontrar soluções. Aprendi a lidar com a incerteza e a adaptar-me a situações em constante evolução, desenvolvendo uma maior flexibilidade e capacidade de tomada de decisões fundamentadas.

A experiência como co-investigadora despertou em mim uma paixão ainda maior pela investigação científica. Foi gratificante ver o meu trabalho contribuir para a compreensão de um determinado tema e potencialmente ter um impacto positivo na saúde e bem-estar da população.

5.4. Ameaças

5.4.1. Falta de meios para realizar o trabalho experimental

Inicialmente, quando me propus à realização deste estágio, o objetivo era trabalhar com modelos animais. No entanto, devido a alguns imprevistos, essa opção não se tornou viável.

Contudo, graças ao enorme empenho da minha orientadora de estágio, conseguimos contornar essa situação e desenvolvemos um estudo em seres humanos, onde conseguimos retirar resultados bastante interessantes.

Referências Bibliográficas

1. AVILA, Maria; OJCIUS, David M.; ZLEM YILMAZ, O. ". - **The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest** Disponível em:www.liebertpub.com
2. KILIAN, M. *et al.* - The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. **British Dental Journal**. . ISSN 17417503. 221:10 (2016) 657–666. doi: 10.1038/sj.bdj.2016.865.
3. BESCOS, Raul *et al.* - Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. **Scientific Reports**. . ISSN 20452322. 10:1 (2020). doi: 10.1038/s41598-020-61912-4.
4. TRIBBLE, Gena D. *et al.* - Frequency of tongue cleaning impacts the human tongue microbiome composition and enterosalivary circulation of nitrate. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. . ISSN 22352988. 9:MAR (2019). doi: 10.3389/fcimb.2019.00039.
5. QU, X. M. *et al.* - From Nitrate to Nitric Oxide: The Role of Salivary Glands and Oral Bacteria. **Journal of Dental Research**. . ISSN 15440591. 95:13 (2016) 1452–1456. doi: 10.1177/0022034516673019.
6. ROCHA, Bárbara S. *et al.* - Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation. **Toxicology**. . ISSN 0300483X. 265:1–2 (2009) 41–48. doi: 10.1016/j.tox.2009.09.008.
7. GÜREL, Emet - SWOT ANALYSIS: A THEORETICAL REVIEW. **Journal of International Social Research**.. ISSN 1307-9581. 10:51 (2017) 994–1006. doi: 10.17719/jisr.2017.1832.

Parte III

Monografia

**“A Influência da Microbiota Intestinal e Transplante de Fezes no tratamento do
Cancro Colorretal”**

Sob a orientação da Professora Doutora Bárbara Rocha

Lista de Abreviaturas

5-FU – 5-Fluorouracilo

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AGCC – Ácidos gordos de cadeia curta

AMPs – Peptídeos antimicrobianos

CCR – Cancro colorretal

CTLA-4 – Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos

dMMR – Deficiência de reparação de incompatibilidade

FDA – *Food and Drug Administration*

FOS – Frutooligossacarídeo

GOS – Galactooligossacarídeos

ICD – Infecção por *Clostridium difficile*

ID – Intestino Delgado

INF- γ – Interferão gama

MI – Microbiota intestinal

MSI-H – Instabilidade de microssatélites elevada

NODr – *Nucleotide-binding oligomerization domain-like*

non-MSI-H – Baixa instabilidade de microssatélites

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PD-1/PD-L1 – Proteína de morte programada 1 / ligante de morte programada 1

pMMR – Proficiência de reparação de incompatibilidade

TGI – Trato gastrointestinal

TJs – *Tight Junctions*

TLR – Recetores *Toll-like*

TMF – Transplante de microbiota fecal

Resumo

A Microbiota Intestinal (MI) tem um grande impacto na saúde e doença do ser humano. Para garantir a eubiose é fundamental existir um equilíbrio entre microrganismos essenciais e patogénicos. Quando este equilíbrio está ausente estamos perante disbiose, que tem sido associada a um grande número de doenças incluindo o cancro.

Vários fatores influenciam a composição da MI, incluindo a dieta, medicamentos e estilo de vida. A utilização de probióticos e prebióticos tem o potencial de modular a sua composição, assim como o transplante de microbiota fecal (TMF). Esta capacidade da MI abre novas perspetivas para identificar novos alvos terapêuticos inovadores na prevenção e tratamento de doenças que têm a sua origem ou são influenciadas pela MI.

O cancro colorretal (CCR) é considerado atualmente um problema de saúde a nível mundial, é uma doença que apresenta vários fatores etiológicos associados, entre eles ambientais e genéticos, onde a deteção precoce é fundamental para aumentar a taxa de sobrevivência e de cura.

Nesta revisão o foco será no impacto que a disbiose da MI pode ter na saúde, diretamente no CCR e como o TMF, no futuro, poderá tornar-se numa ferramenta promissora para o tratamento ou como adjuvante na terapia do CCR.

Palavras-chave: Cancro colorretal, Microbiota Intestinal, Transplante de microbiota fecal.

Abstract

The gut microbiota has a significant impact on human health and disease. To maintain eubiosis, it is crucial to achieve a balance between beneficial and pathogenic microorganisms. When this balance is disrupted, it leads to dysbiosis, which has been associated with numerous diseases, including cancer.

Various factors influence the composition of gut microbiota, including diet, drugs and lifestyle. The use of probiotics and prebiotics has the potential to modulate its composition, as well as fecal microbiota transplantation. The potential of gut microbiota offers new insights to explore innovative therapeutic targets for preventing and treating diseases influenced by gut microbiota or originating from it.

Colorectal cancer is currently a global health problem, with various etiological factors associated, including environmental and genetic factors. Early detection is crucial to increase the survival and cure rate.

In this review, the focus will be on the impact of gut microbiota dysbiosis on health, particularly in colorectal cancer, and how fecal microbiota transplantation could potentially become a promising tool for the treatment or adjuvant therapy of colorectal cancer in the future.

Keywords: Colorectal cancer, Gut Microbiota, Fecal microbiota transplantation.

I. Introdução

O trato gastrointestinal (TGI) alberga aproximadamente 100 bilhões de microrganismos que coexistem numa relação simbiótica com o organismo humano.^{1, 2} O conjunto de bactérias, vírus, fungos, archae e os seus metabolitos são denominados por microbiota intestinal (MI).²

Hipócrates, o pai da medicina moderna, afirmou que “todas as doenças começavam no intestino”. Atualmente, 2000 anos depois, a comunidade científica tem-se dedicado a aumentar o conhecimento sobre a MI com o intuito de perceber a sua influência em diversas patologias. Avanços nas tecnologias e técnicas de análise têm permitido uma compreensão mais profunda da complexa interação entre MI e o organismo humano.

Existem evidências que sugerem uma associação entre o desenvolvimento de cancro colorretal (CCR) e a composição da MI. A disbiose, caracterizada por uma redução da diversidade e alteração da composição da MI, juntamente com alterações na permeabilidade da parede intestinal, tem sido associada ao desenvolvimento de CCR. Além disso, essas alterações podem influenciar a eficácia dos tratamentos utilizados para o CCR e aumentar o risco de efeitos secundários. Compreender melhor a relação entre a MI e o CCR pode abrir novas oportunidades para intervenções terapêuticas direcionadas à modulação da MI, visando melhorar os resultados do tratamento e a qualidade de vida dos doentes com CCR.

Atualmente, há uma ampla gama de terapias para restaurar a MI em doentes. Uma estratégia promissora é o TMF, que consiste na infusão de matéria fecal de um dador num doente. Embora o TMF seja considerado uma terapia inovadora, a sua origem remonta a mais de 2500 anos. No entanto, os primeiros registos formais de TMF datam 1958, quando foi usado para o tratamento de colite pseudomembranosa.³ Desde então, o TMF tem sido explorado como uma opção terapêutica promissora em diversas patologias relacionadas à disbiose e desequilíbrio da MI.

2. Microbiota Intestinal

O corpo humano é um sistema complexo e altamente dinâmico, que é constituído por células humanas e por células de múltiplos microrganismos. Estudos recentes revelaram que o rácio entre células humanas e células de microrganismos é perto de 1:1.¹ O TGI é a região com a maior concentração de microrganismos em todo o corpo humano, sendo o cólon responsável por abrigar mais de 70% desses microrganismos.² Devido às suas funções e complexidade, atualmente, a microbiota já é reconhecida como um órgão do corpo humano, que tem influência na homeostase e na doença.²

2.1. Composição da Microbiota Intestinal

A composição da MI inclui membros dos três domínios- Bacteria, Archaea, Eukarya, apesar das bactérias anaeróbicas serem dominantes.⁴ Os filos de bactérias anaeróbicas: *Firmicutes* ou *Bacteroidetes*, representam a maioria, com mais de 90%, das bactérias presentes no TGI.⁴ Além desses filos predominantes, também são encontrados filos menos abundantes, como *Verrumicrobia*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, contribuindo para a diversidade microbiana.²

A composição da MI varia ao longo do comprimento do TGI, bem como a nível axial.⁴ À medida que avança desde o intestino delgado (ID) até ao colon, a diversidade aumenta, com diferentes espécies bacterianas predominando em diferentes segmentos do intestino. Além disso, a composição da MI também apresenta variações entre indivíduos. Essa diversidade interindividual é uma característica importante da MI e pode ter implicações significativas para a saúde e doença, bem como para a resposta a terapias.⁴

2.2. Funções Fisiológicas

A MI estabelece uma relação simbiótica e dinâmica com o ser humano, que providencia benefícios tanto a nível local como sistémico, incluindo manutenção da integridade da barreira intestinal, proteção contra patogénios, funções imunitárias e metabólicas, síntese de vitaminas (vitamina B e K) e de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC).^{3, 5, 6}

Ao longo do TGI, ocorre a digestão de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, sendo no cólon onde ocorre a digestão de fibras provenientes da dieta como oligossacarídeos e polissacarídeos. Os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são capazes de utilizar os polissacarídeos como fonte de carbono, resultando na sua fermentação. Esses processos fermentativos produzem gases, como metano ou dióxido de carbono; além de AGCC, como acetato, propionato e butirato; ácidos orgânicos e álcoois.

Os AGCC são absorvidos no cólon onde servem como fonte de energia quer para os colonócitos, quer para a MI e são cruciais para a saúde gastrointestinal.⁷ Além disso, os AGCC podem ser absorvidos por difusão ou por transportadores presentes nos enterócitos, permitindo a manutenção da função barreira, homeostase energética e imunitária, redução da inflamação e inibição da progressão tumoral.⁸

A MI tem também um papel fundamental na síntese de vitaminas essenciais como a biotina, cobalamina, e também vitamina B e K, contribuindo para a saúde geral do organismo.⁹

A camada epitelial intestinal desempenha um papel crucial na proteção e regulação da permeabilidade da barreira intestinal.¹⁰ Essa camada consiste em células epiteliais que formam uma barreira física contínua, separando a flora intestinal do tecido interno.¹¹ As células epiteliais estão unidas entre si através das *tight junctions* (TJs), estruturas que desempenham um papel fundamental na regulação da permeabilidade da barreira intestinal.¹⁰

Alterações na função das TJs podem levar a um aumento da permeabilidade intestinal, fenômeno conhecido como “leaky gut” ou intestino permeável.^{11, 12, 13} Isso pode permitir a passagem de compostos prejudiciais para o tecido interno, desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica e contribuindo por exemplo para o desenvolvimento de doenças intestinais.¹³ É fundamental manter a integridade da camada epitelial intestinal e a função adequada das TJs para preservar a saúde gastrointestinal e a homeostase do organismo.¹⁰

A camada de muco presente no intestino é composta por uma matriz de glicoproteínas secretadas pelas células caliciformes, que estão presentes no epitélio intestinal.¹⁴ Essa camada de muco é a primeira barreira de defesa do organismo.^{12, 15} A sua principal função é de barreira física contra patógenos, impedindo a sua adesão e invasão. Além disso, o muco também desempenha um papel importante na interação com a MI, fornecendo hidratos de carbono e peptídeos que servem como nutrientes às bactérias da MI.¹⁵ Para o bom funcionamento da camada de muco é necessário uma boa interação com a MI; por exemplo estudos têm demonstrado que certas bactérias do filo *Bacteroidetes* têm a capacidade de ativar as células caliciformes para aumentar a produção de muco.¹⁵ Essa interação benéfica ajuda a fortalecer a barreira protetora do intestino e a promover um equilíbrio saudável entre o hospedeiro e a MI (**Figura I**).¹⁴

Para além da camada de muco, existem outras moléculas que exercem um papel importante na proteção do intestino. Entre essas moléculas estão os peptídeos antimicrobianos (AMPs), como defensinas, catelicidinas e lectinas tipo-C, que são produzidos nas células de Paneth, encontradas nas criptas intestinais (**Figura I**).¹⁶ Os AMPs são moléculas do sistema imunológico inato, que desempenham um papel crucial na defesa contra bactérias patogênicas.¹⁷ Estes possuem propriedades antimicrobianas, ou seja, são capazes de perturbar a superfície das bactérias, prejudicando a sua integridade e capacidade de sobrevivência.¹⁷

A MI produz metabolitos designados *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) que são reconhecidos por recetores de reconhecimento de padrões.¹⁶ Estes recetores estão presentes na membrana plasmática e citoplasma de várias células do sistema inato- fagócitos, células dendríticas, que quando ativados iniciam a transdução e produção de sinais pró-inflamatórios. Estes recetores incluem os recetores *Toll-like* (TLR) e recetores *nucleotide-*

binding oligomerization domain-like (NODr). A ligação dos PAMPs aos recetores TLR e NODr ativa a resposta imune, desencadeando uma série de eventos tais como, o recrutamento de moléculas que iniciam vias de sinalização celular que levam à ativação de fatores de transcrição que vão induzir a expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas antimicrobianas, que visam combater possíveis invasores e manter a homeostase do TGI (**Figura 1**).¹⁶

Os AGCC resultantes da fermentação das fibras alimentares desempenham um papel para além de metabólico. Contribuem também para a regulação do sistema imunitário, resposta anti-inflamatória e atividade anticancerígena.¹⁸

Para além dos AGCC, certas espécies bacterianas, como as do género *Lactobacillus*, possuem a capacidade de produzir ácido láctico. O ácido láctico tem propriedades antimicrobianas e é capaz de romper a membrana externa da parede celular bacteriana, inibindo o crescimento de bactérias patogénicas.⁴

Por fim, a MI desempenha um papel fundamental na função do sistema imunitário, tanto na da imunidade inata como na adaptativa, com consequente interferência na proliferação de bactérias patogénicas.⁴

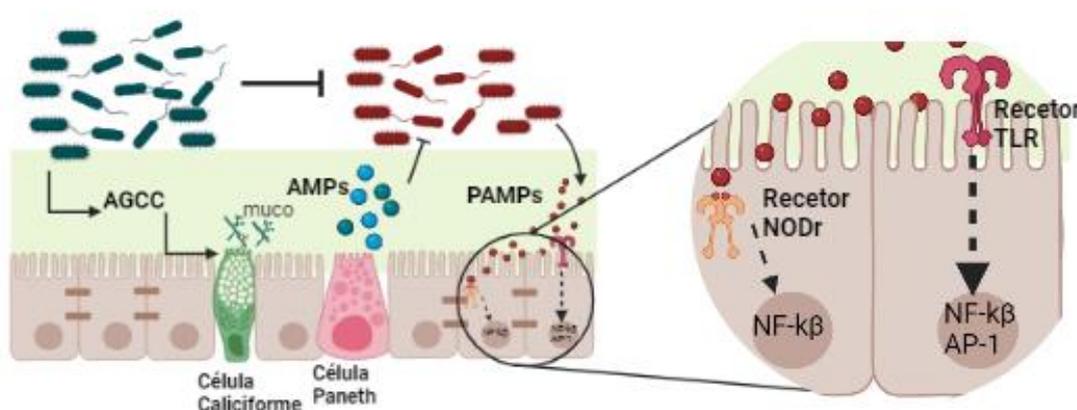


Figura 1. Interações entre a superfície epitelial intestinal e a Microbiota Intestinal. Os ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) resultantes da fermentação de fibras da dieta são utilizados pelas células caliciformes para a síntese de muco, fundamental para a função barreira da parede intestinal. Além disso, as células Paneth localizadas na superfície epitelial intestinal contribuem com a produção de peptídeos antimicrobianos (AMP). A ativação dos recetores do tipo Toll (TLRs) e do tipo NOD (NODr) ocorre em resposta a componentes microbianos – *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), o que desencadeiam a ativação do NF- κ B e do fator de transcrição AP-1. Esses fatores, por sua vez, promovem a transcrição de citocinas inflamatórias e de mediadores antimicrobianos, desempenhando um papel crucial na modulação das respostas imunológicas e na manutenção da homeostase intestinal.

2.3. Fatores que Influenciam a Composição

A microbiota é um sistema dinâmico, ou seja, a sua composição não é uniforme ao longo de toda a vida, sendo afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Fatores como o metabolismo, genética, estilo de vida e exposição a antibióticos podem afetar a composição da microbiota.^{13, 14} Durante os primeiros anos de vida, ocorre uma diversificação em direção à composição observada na idade adulta, sendo influenciada por fatores como o tipo de parto, alimentação, genética e ambiente.⁴ Na vida adulta, a composição é relativamente estável e equilibrada, mas está constantemente sujeita a perturbações. Nos idosos, a microbiota tende a ser menos diversificada devido a alterações fisiológicas, estilo de vida, dieta e polimedicação.^{19, 20}

No momento em que a MI sofre um desajuste, existe forte probabilidade de ocorrer o desenvolvimento de diversas doenças intestinais, como doença do intestino irritável, síndrome do intestino irritável, obstipação crônica, diarreia ou CCR.^{15 16}

2.3.1. Dieta e Estilo de Vida

A dieta desempenha um papel fundamental na modulação da MI, podendo influenciar a proporção de diferentes espécies bacterianas e a produção de metabolitos no intestino.²¹ Uma dieta rica em altos teores de gordura está associada ao aumento de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* e *Proteobacteria*, enquanto ocorre uma diminuição de *Bacteroidetes*.^{17, 18}

Além disso, a dieta pode influenciar diretamente a produção de metabolitos no intestino, como AGCC.²² Uma dieta rica em fibras alimentares, por exemplo, pode aumentar a produção de AGCC, que têm efeitos benéficos na saúde intestinal, incluindo na regulação da função barreira, na modulação da resposta imunológica e na redução da inflamação.^{1, 23}

Numa dieta rica em proteínas de origem animal, ocorre a hidrólise da proteína não digerida em peptídeos e aminoácidos pelas proteases e peptidases bacterianas, sendo que os metabolitos resultantes dessas reações incluem óxido nítrico, compostos aromáticos como o fenol, AGCC e amônia. Foi demonstrado que alguns destes compostos, como o fenol, podem estar associados ao desenvolvimento de doença inflamatória intestinal e CCR.²⁴

Além da dieta, o estilo de vida influencia a MI, isso inclui a prática de exercício físico, o nível de *stress* e o ciclo circadiano.²⁰ Estudos têm demonstrado que a prática de exercício físico está associado a um aumento da biodiversidade da MI, possuindo um papel importante na regulação da inflamação, aumentando a produção de AGCC.²⁵

A composição da MI é influenciada e perturbada pelo ciclo circadiano, por exemplo quando há uma diminuição do número de horas de sono.²⁰ Além disso, o próprio intestino possui um ciclo circadiano regulado pelo horário das refeições e pela qualidade das mesmas.²⁶

2.3.2. Antibióticos

A toma de antibióticos apresenta vantagens e desvantagens. Por um lado, os antibióticos são eficazes na eliminação de bactérias patogénicas e no tratamento de infeções de origem bacteriana, no entanto, causam perturbações na MI, uma vez que não diferenciam entre as bactérias patogénicas e as comensais.^{18, 27} Este problema é agravado, muitas vezes, pelo uso de antibióticos de largo espectro, causando alterações na MI que podem persistir mesmo após o término da terapia.^{4, 18, 27} A disbiose causada pela toma de antibióticos pode afetar o desenvolvimento e regulação do sistema imunitário, aumentando o risco de diversas doenças intestinais.^{28, 29}

2.3.3. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando ingeridos nas quantidades adequadas conferem benefícios à saúde.³⁰ Dos probióticos mais utilizados destacam-se as espécies pertencentes aos filós *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ambas bactérias com capacidade de produzir de ácido láctico, que estão presentes, por exemplo, em iogurtes, queijos e pickles.³¹

Os probióticos desempenham diversas funções no organismo, entre elas, incluem-se a diminuição do pH intestinal, produção de AGCC, aumento da secreção de muco pelas células calciformes e estimulação do sistema imunitário.^{21, 22, 32} Estes conferem benefício sem alterar permanentemente a MI, mas mesmo uma colonização transitória está associada a benefícios para o ser humano, podendo os probióticos ser usados na prevenção e tratamento de algumas doenças como por exemplo o cancro devido às propriedades referidas anteriormente.⁵

Os prebióticos são nutrientes não digeríveis que promovem o crescimento e atividade de bactérias benéficas no intestino, melhorando a saúde do hospedeiro. Entre as diferentes classes de prebióticos, destacam-se os oligossacarídeos e as fibras alimentares não digeríveis, como galactooligosacarídeos (GOS) e frutooligosacarídeos (FOS).³¹ A principal fonte de prebióticos é a dieta (frutas, vegetais e cereais). Estes são fermentados pelas bactérias da MI, resultando na produção de AGCC e outros metabolitos benéficos que providenciam nutrientes essenciais para o bom funcionamento do intestino.⁵

Simbióticos são uma combinação de probióticos e prebióticos, que visam obter os benefícios das propriedades de ambos os constituintes. Para a correta utilização tem de se ter em consideração o doente que os vai consumir. Uma das aplicações mais promissoras é na suplementação de inulina e probióticos para reduzir o risco de CCR. Essa combinação atua na produção de AGCC, que promovem a regulação do crescimento celular, induzem a apoptose e auxiliam no aperfeiçoamento do sistema imunitário.³²

3. Cancro Colorretal

3.1. Fisiologia e Epidemiologia

O CCR é o terceiro cancro mais prevalente no mundo e a sua incidência está a aumentar nos países desenvolvidos, números que podem ser explicados pela dieta e estilo de vida.³³ De acordo com dados de 2020, o CCR é o segundo cancro mais comum em Portugal, tanto em homens como em mulheres. Além disso, em relação à mortalidade, o CCR ocupa, também, o segundo lugar entre as principais causas de morte por cancro no país.³⁴

O CCR é uma doença multifatorial que envolve uma complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e moleculares. Uma das principais vias é a adenoma-carcinoma, na qual a transformação maligna ocorre a partir de adenomas pré-existentes, crescendo gradualmente em direção à malignidade.³⁵

Alterações genéticas, como mutações em genes supressores tumorais, oncogenes e genes com a função de reparação celular são observadas em células tumorais. Essas mutações acumuladas ao longo do tempo podem levar a perturbações no controlo do ciclo celular, apoptose e reparação do DNA.³⁶ Além disso, a inflamação crónica desempenha um papel significativo no desenvolvimento do CCR. A presença prolongada de inflamação no intestino, muitas vezes associada à doença inflamatória intestinal, pode levar a danos nas células e ao aumento do risco de mutações genéticas.^{35, 36}

A influência da MI também é um componente emergente no mecanismo patogénico. Desequilíbrios na composição da microbiota podem levar a um estado de disbiose, que pode impactar a função de barreira intestinal, inflamação local e até mesmo a resposta imunológica, contribuindo para o desenvolvimento do CCR.³⁶

Além disso, uma alimentação caracterizada por um elevado consumo de proteína animal e gorduras, e uma baixa ingestão de fibras, pode aumentar o risco de desenvolvimento de CCR. Portanto, melhorar a qualidade da dieta está associado a uma redução no risco de CCR.^{36, 37}

A grande maioria dos CCR ocorre de forma esporádica, onde as mutações se manifestam em células somáticas que se dividem e transformam em células cancerígenas. No entanto, também existem formas hereditárias de CCR, nas quais a mutação inicial é herdada e, conseqüentemente, está presente em todas as células do organismo. Exemplos dessas formas incluem a doença poliposa adenomatosa familiar ou o cancro colorretal hereditário não polipóide.³⁵

O risco de desenvolver CCR também aumenta com o avanço da idade, uma vez que a maioria dos indivíduos afetados têm mais de 50 anos.³⁸

O desenvolvimento de CCR demora cerca de 10 anos, ou seja, torna-o um cancro onde a sua deteção precoce aumenta a taxa de sucesso ao tratamento, devido à diminuição da incidência de doença avançada e conseqüente diminuição da mortalidade.³³ As características histopatológicas do CCR tornam esta neoplasia adequada para ser rastreada, uma vez que, o adenocarcinoma na sua grande maioria tem origem em lesões poliposas benignas.³⁹

Diversos países, incluindo Portugal, implementaram programas de prevenção do CCR.⁴⁰ A estratégia principal consiste na realização de exames de pesquisa de sangue oculto nas fezes, seguidos, geralmente, de uma colonoscopia caso o teste apresente resultado positivo.⁴⁰

3.2. A Microbiota Intestinal em doentes com Cancro Colorretal

Estudos recentes revelaram alterações na MI em doentes com CCR, sugerindo que a MI pode ter um papel fundamental no começo e desenvolvimento do CCR. A carcinogenicidade é desencadeada por um conjunto de mecanismos dependentes da MI e do hospedeiro.⁴¹

A disbiose pode afetar a suscetibilidade e progressão do CCR, através de diversos mecanismos como inflamação, indução de dano no ácido desoxirribonucleico (ADN) e produção de metabolitos que induzem o crescimento tumoral.³⁶

Quando se procede ao TMF onde o dador sofre de CCR e o recetor é saudável, este procedimento pode ser suficiente para causar a desregulação da barreira epitelial e resultar em disbiose.⁴² Um estudo demonstrou que ratinhos *germ-free* que receberam transplante de fezes de pares com CCR apresentaram um aumento no grau de displasia e uma maior prevalência de pólipos.⁴² Além disso, foi observada uma diminuição da riqueza da MI nos ratinhos que foram transplantados em relação aos controlo.⁴²

A MI nos doentes com CCR é normalmente rica em bactérias patogénicas que produzem metabolitos pró-inflamatórios e pobre em bactérias produtoras de AGCC, por exemplo butirato (responsáveis pela preservação da homeostase intestinal). Não foi encontrado um

microrganismo único responsável pelo aparecimento do CCR, mas sim um conjunto de fatores e microrganismos alterados que conduzem à disbiose intestinal.^{43, 44}

Em amostras de fezes de doentes com CCR foi identificada uma MI rica em *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* e *Fusobacterium nucleatum*, bactérias estas responsáveis por promover inflamação, prejudicar a atividade anti-tumoral e induzir dano no ADN.⁴⁵ Devido à alta prevalência de *Fusobacterium* na microbiota fecal de doentes com CCR, esta bactéria pode ser usada como um marcador de pré-diagnóstico de CCR.^{30, 31, 46}

Por outro lado, as bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes*, como *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* estão sub-representadas nos doentes com CCR, e estas bactérias apresentam atividade anti-tumoral diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, fortalecendo a resposta imunitária, regulando a integridade da barreira intestinal e produzindo AGCC.⁴⁷

3.3. Efeito da Microbiota Intestinal na efetividade da Quimioterapia, Radioterapia e Imunoterapia

A MI tem impacto na progressão do CCR, mas também modula a resposta dos doentes às terapias aplicadas. A composição da MI e as diferenças interindividuais são fatores responsáveis pela heterogeneidade na resposta aos tratamentos e ao aparecimento de efeitos tóxicos.⁴⁸

3.3.1. Quimioterapia e Radioterapia

A quimioterapia e a radioterapia são utilizadas como tratamento neoadjuvante ou adjuvante, antes ou após a cirurgia, visando reduzir ou estabilizar a dimensão do tumor. No entanto, estas terapias estão associadas a numerosos efeitos colaterais, riscos de toxicidade, bem como, apresentam baixa resposta, resistência e especificidade limitada para o tumor em determinados indivíduos.⁴⁹

A MI tem efeito na eficácia da quimioterapia, podendo alterar ou metabolizar fármacos anti tumorais usados no tratamento do CCR.⁵⁰ O fármaco de primeira linha no tratamento do CCR é o 5-fluorouracilo (5-FU), que é metabolizado por bactérias pertencentes ao filo *Bacteroides* presente na MI. Quando o doente apresenta disbiose, o rácio de *Bacteroides* pode estar diminuído, resultando numa redução da degradação do 5-FU. Isso pode levar à acumulação de 5-FU na corrente sanguínea, aumentando o risco de toxicidade associado ao medicamento.^{39, 42} Alguns estudos têm sugerido que a suplementação com AGCC, principalmente butirato, aquando da toma do 5-FU pode ajudar a reduzir a inflamação da mucosa intestinal e fortalecer a barreira epitelial, potencialmente minimizando os efeitos adversos gastrointestinais associados ao tratamento com 5-FU. No entanto, é importante

salientar que são necessários mais estudos para validar esses efeitos e determinar as doses ideais e a segurança da suplementação com AGCC em combinação com o 5-FU.⁵¹

O irinotecano, uma outra alternativa quimioterapêutica, é um pró-fármaco que requer metabolização no fígado para exercer a sua atividade, sendo convertido em SN-38. Em seguida, passa por uma reação de glucoronidação, transformando-se em SN-38G, que é excretado no intestino para posterior eliminação.⁵² Na presença de β - glucoridases, existe uma reativação, havendo um aumento do SN-38, resultando em diarreias severas para o doente.^{36, 42} A toxicidade deste fármaco pode variar de pessoa para pessoa. Em alguns casos, utilizam-se antibióticos para reduzir essa toxicidade, mas é importante destacar que o uso de antibióticos pode resultar na redução da diversidade da MI, comprometendo a sua função protetora. Uma alternativa promissora é modelar a MI por meio do consumo de fibras.⁵³ Existem estudos que mostram que a toxicidade do irinotecano é parcialmente revertida se existir um aumento da produção de butirato.^{45, 54} Estudos demonstram que a presença de *Lactobacillus acidophilus*, bactéria produtora de AGCC, durante a terapia com oxaliplatina ou cisplatina, pode restaurar a atividade anti tumoral do fármaco.⁵⁵

A radioterapia é outra estratégia usada para o tratamento do CCR. Estudos referem que a radioterapia pode influenciar a constituição da MI, e que a composição e diversidade da MI podem, por sua vez, afetar a eficácia e a toxicidade do tratamento. Alguns estudos sugerem que a radioterapia pode reduzir o rácio *Firmicutes/Bacteroidetes*, enquanto aumenta a presença de bactérias como *Fusobacterium* e *Proteobacteria*. Essas alterações na composição microbiana podem desempenhar um papel importante nos resultados clínicos da radioterapia.⁵⁶

3.3.2. Imunoterapia

A imunoterapia é uma abordagem promissora no tratamento do CCR, que tem como objetivo fortalecer a resposta imunológica do organismo, ajudando a reconhecer e destruir as células tumorais.⁵⁷ Embora existam estratégias promissoras utilizadas no tratamento do CCR, como proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e proteína de morte programada I/ ligante de morte programada I (PD-I/PD-LI), é importante ressaltar que essa abordagem não é efetiva para a grande maioria dos casos de CCR. A diversidade da composição da MI pode ser um fator importante na resposta ao tratamento do CCR. É observado que alguns doentes não respondem ao tratamento (poderá dever-se a uma MI desfavorável), enquanto outros apresentam uma resposta positiva (poderá dever-se a uma MI favorável).^{57, 58} Estudos têm demonstrado que a MI pode influenciar a resposta à imunoterapia no CCR, ou seja, certas espécies bacterianas estão associadas a melhores resultados e a uma

maior taxa de resposta aos tratamentos, enquanto a ausência ou presença de outras espécies bacterianas pode estar relacionada a uma menor resposta ou resistência ao tratamento.⁵⁹

Mecanismos propostos incluem a capacidade das bactérias em modular a inflamação, ativar as células imunes e influenciar as vias de *checkpoint* imunológico. Os doentes com CCR podem ser classificados em dois grandes grupos em relação à reparação de incompatibilidades e instabilidade de microssatélites. O primeiro grupo é caracterizado pela deficiência de reparação de incompatibilidade (dMMR) / instabilidade de microssatélites elevada (MSI-H), enquanto o segundo grupo apresenta proficiência de reparação de incompatibilidade (pMMR) / níveis baixos instabilidade de microssatélites (non-MSI-H).⁶⁰

A deficiência de reparação de incompatibilidade, é uma condição em que os mecanismos de reparação de erros no emparelhamento de pares de bases no ADN estão comprometidos. Esses erros são pequenas variações no número de repetições de sequências de ADN, chamadas microssatélites. Isto pode ocorrer devido a mutações em genes específicos envolvidos no processo de reparação, conhecidos como genes de reparação de microssatélites.⁵⁷

A instabilidade de microssatélites está associada a uma resposta imune mais intensa contra células tumorais, tornando esses tumores potencialmente mais sensíveis à imunoterapia, como os inibidores PD-1/PD-L1. Portanto, a detecção da deficiência de reparação de incompatibilidade é importante na prática clínica, pois pode ter implicações no diagnóstico, prognóstico e tratamento do cancro.⁶⁰

O PD-1/PD-L1 são um par de *immune checkpoints*, que têm um papel crucial no processo da fuga ao sistema imunitário por parte do tumor. Após a sua ligação, as células tumorais reconhecem os recetores dos linfócitos T e invadem o sistema imunitário. Isto pode ser revertido usando anticorpos monoclonais contra ambos os recetores. A terapia anti-PD-1/PD-L1 só é eficaz em doentes com dMMR / MSI-H, porque existe uma maior infiltração de linfócitos T no tecido tumoral.⁶⁰ Dois exemplos de anticorpos monoclonais com este mecanismo de ação aprovados são o pembrolizumab e o nivolumab (**Figura 2**).⁶⁰

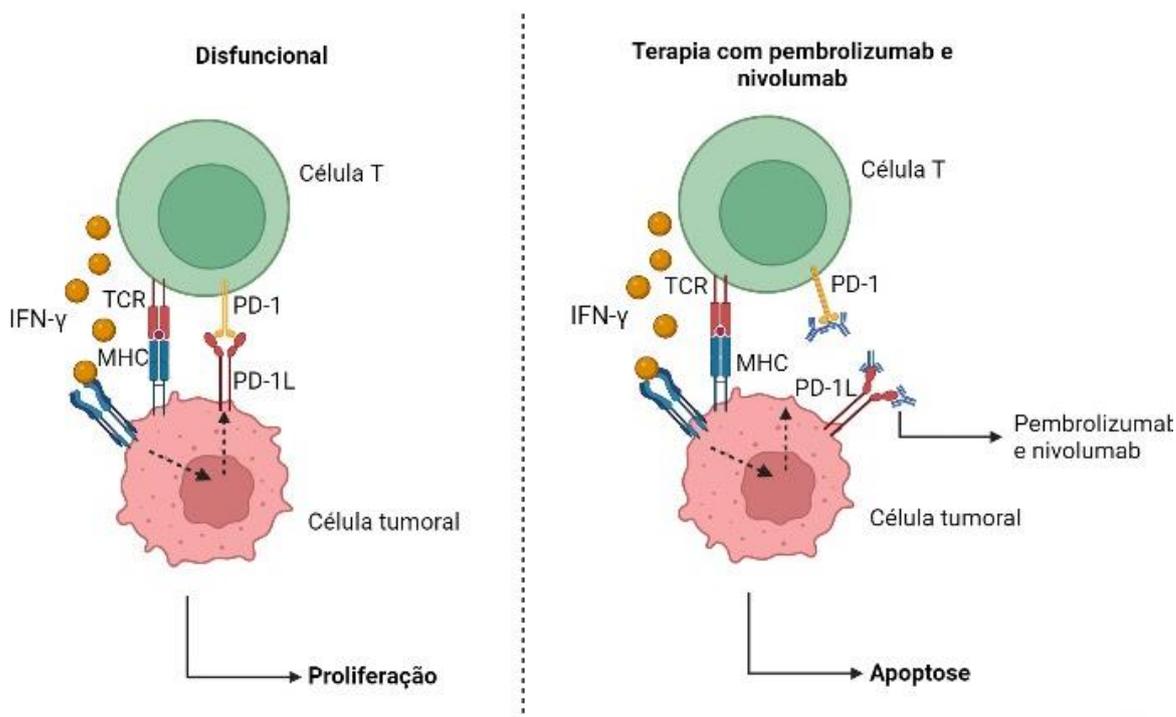


Figura 2- Esquema do mecanismo de ação dos inibidores PD-1/PD-L1, com o intuito de restaurar as funções das células T. A apoptose das células T é desencadeada quando o PD-L1 se liga ao seu receptor PD-1, resultando na evasão imunológica. Os anticorpos anti-PD-1/PD-L1 prejudicam a ligação entre PD-1 e PD-L1, permitindo que as células T reativem, proliferem e ataquem as células tumorais, levando à sua morte. A PD-L1 é *upregulated* em resposta a sinais inflamatórios (por exemplo, IFN- γ) produzidos pelas células T ativadas.⁶⁰

O ipilimumab é um anticorpo monoclonal que atua como bloqueador do receptor CTLA-4, desempenhando um papel importante na regulação da atividade dos linfócitos T.⁶¹ Este está aprovado em Portugal desde 2011 para o CCR com dMMR e MSI-H. A sua efetividade está relacionada com a composição da MI. Estudos realizados em modelos animais têm demonstrado que o ipilimumab é capaz de reduzir o tamanho do tumor em ratos com a MI normal. No entanto, em ratinhos *germ-free* ou em animais sujeitos a antibióticos, o ipilimumab não apresentou o mesmo efeito terapêutico.⁶¹

4. Transplante fecal

4.1. Definição

O TMF, é um método que envolve a injeção de matéria fecal de pessoas saudáveis para restaurar a composição da MI de alguns doentes que sofrem de disbiose, com o intuito de restabelecer a eubiose. É necessário ter em atenção que para o sucesso do procedimento é fundamental a estrutura intestinal da microbiota ser semelhante entre o dador e o recetor.²⁸

O TMF consiste na colheita e processamento de matéria fecal de um dador saudável e administração com recurso a procedimentos como uma colonoscopia ou enema.

Esta técnica é frequentemente usada para o tratamento da infeção por *Clostridium difficile* (ICD) recorrente ou difícil de tratar, e foi considerada altamente eficaz, visto que restabelece a MI comensal eliminada pelo tratamento com antibióticos.⁶²

O TMF revela ser uma alternativa importante ao uso de antibióticos que destroem uma parte importante das bactérias da MI, e este método providencia a produção de AMPs e a ativação do sistema imunitário presente na camada de muco do intestino.²⁸

4.2. Preparação e Procedimento

Para reduzir e prevenir o aparecimento de efeitos adversos e garantir a segurança do doente, é necessário os dadores de fezes serem indivíduos saudáveis e que sejam submetidos a uma série de análises e que cumpram critérios muito específicos. O candidato é questionado sobre a sua história médica, doenças prévias, histórico de viagens, doenças familiares e exposição a fatores que aumentem o risco de transmissão de doenças.³ Os dadores têm também de realizar um teste de triagem no sangue e fezes para excluir doenças transmissíveis.⁶³ É também essencial conhecer a história médica familiar do dador, de forma a prevenir a transmissão de qualquer doença autoimune, bem como se existe predisposição. Deste modo, o dador ideal é o cônjuge ou um familiar próximo, porque é expectável que a matéria fecal seja semelhante, diminuindo assim alguns riscos.⁶⁴

Para garantir a seleção adequada de dadores, foram estabelecidos bancos de matéria fecal, dos quais se destacam o *OpenBiome* nos Estados Unidos e o *Tergooi FMT Bank* nos Países Baixos, que disponibilizam fezes seguras e de alta qualidade para a realização do TMF.⁶⁵

Não existe um protocolo padrão para a preparação da matéria fecal. Após serem recolhidas, as fezes do dador podem ser usadas no imediato ou ser congeladas e armazenadas para uso posterior. Existem estudos que provam que não existe diferença na efetividade e segurança do TMF, usando fezes frescas ou congeladas, para tal é necessário garantir as condições ideais de conservação.^{64, 66}

Após a colheita, as fezes são diluídas numa solução salina estéril numa proporção 3 a 5 vezes a quantidade inicial de fezes. A quantidade ideal de colheita é 50 gramas, que serão posteriormente diluídas. Em seguida, a solução é homogeneizada e filtrada para remover quaisquer partículas que possam obstruir a infusão final.^{3, 63} No caso da preparação a partir de material fecal congelado, o processo é semelhante ao descrito anteriormente. É importante

realçar que antes do congelamento do material fecal do dador é adicionado glicerol a 10% para proteger as células microbianas das condições adversas às quais serão submetidas.⁶³

No dia anterior à realização do TMF, com o intuito de preparar o TGI para a infusão, habitualmente, são administrados via oral 2L de uma solução de macrogol.³ O macrogol é um laxante osmóticos que tem como função acelerar a motilidade intestinal.

Existem diversas vias possíveis para este procedimento, desde a via nasogástrica, a endoscopia, a utilização de enemas ou a colonoscopia, cada via com vantagens e desvantagens, onde a efetividade e segurança é semelhante em todas. A seleção da via deve ter em conta a doença que se quer tratar, o doente, as contraindicações de cada via e a relação custo/benefício.

4.3. Indicações e Efeitos Secundários

A única indicação aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos, para o recurso ao TMF é para o tratamento da ICD recorrente ou refratária. Para além desta indicação existem outras com potencial que estão em investigação, entre as quais se realçam a doença intestinal inflamatória, obstipação, CCR e patologias extra-gastrointestinais.

Para além dos riscos, existem efeitos adversos que podem se dever ao procedimento propriamente dito, por exemplo perfuração intestinal ou hemorragia ou que estão relacionados com o dador e com a adaptação do doente após o TMF, e que devem ser monitorizados, entre eles, febre, dores abdominais, diarreia, flatulência e fadiga.³ De realçar que todos os efeitos referidos anteriormente são normalmente são autolimitados e de auto-resolução.³

Os doentes sujeitos ao TMF devem ser monitorizados, no sentido de avaliar a progressão da doença e da gestão dos efeitos secundários. É fundamental existir uma comparação com a fase pré-transplante, em relação à consistência, cor e número de defecações diárias.

4.4. Vantagens e Desvantagens

Comparando com outras estratégias de modulação da MI, o TMF apresenta algumas vantagens, dado que aumenta a diversidade da MI. Tem também efeito terapêutico benéfico em relação aos probióticos e prebióticos, pois nos probióticos e prebióticos a colonização aparenta ser transitória. Outra vantagem é que o TMF permite uma recuperação da diversidade da MI, desde bactérias, vírus, eucariotas e metabolitos.

O TMF é uma abordagem terapêutica recente e inovadora, que é muito promissora, no entanto, ainda existe falta de estudos abrangentes que investiguem sobre a sua segurança a longo prazo.

É importante salientar também os riscos associados aos inúmeros componentes desconhecidos presentes nas fezes dos dadores. Esses riscos incluem a possibilidade de transmissão de patógenos, transmissão de elementos recessivos silenciosos presentes nos dadores saudáveis e a potencial transmissão de fatores relacionados a doenças crônicas. Em 2019, a FDA emitiu um alerta de segurança relacionado com o uso da TMF, destacando o risco de transmissão de organismos multirresistentes. Este alerta deveu-se à morte de um indivíduo que foi submetido ao TMF, onde o dador da matéria fecal não foi testado para a presença de *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro alargado e esta foi transferida para o recetor causando a sua morte. Portanto, foram estabelecidos critérios adicionais, incluindo a necessidade de realizar teste às fezes para avaliar a presença de organismos multirresistentes.^{67, 68, 69}

O impacto no sistema imune é imprevisível e o risco de disseminação de patógenos não conhecidos não pode ser esquecido. A possibilidade de se submeter ao TMF deve ter sempre em conta a relação benefício/risco, pois este tratamento pode salvar a vida em certos doentes.

4.5. Potencial do Transplante Fecal no tratamento do Cancro Colorretal

Apesar da falta de evidência do uso do TMF no tratamento do CCR, sabe-se que a MI nos doentes com CCR está alterada e está provado que essa MI quando inserida em ratinhos *germ-free* induz carcinogenicidade, mas existe uma razão plausível para acreditar que o TMF pode ter potencial clínico.⁴² Estudos utilizando modelos animais de CCR, o TMF demonstrou capacidade de restabelecer a diversidade da MI e reduzir o crescimento tumoral. Além disso, o TMF também contribuiu para a redução da inflamação associada ao CCR.⁷⁰

Ao submeter os doentes ao TMF, reduz a proporção de espécies patogénicas e aumenta a proporção de espécies que exibem propriedades anti-inflamatórias.

Adicionalmente, o TMF também demonstrou ter impacto na quimioterapia, podendo reduzir a severidade dos efeitos secundários, como diarreia ou mucosite. Este também restaura o número de células caliciformes, presentes na parede intestinal, e melhora a expressão dos recetores TLR.⁷⁰

Foi reportado num estudo que o TMF em ratos sujeitos a radioterapia, melhorou a integridade da barreira intestinal e a composição da MI, aumentando a taxa de sobrevivência.

Os autores sugeriram que o TMF no futuro poderá ser usado como ferramenta para aumentar a taxa de sucesso no tratamento do cancro.⁷¹

Existem dois estudos clínicos atualmente em desenvolvimento que têm como objetivo avaliar a ação do TMF na eficácia da imunoterapia usando os anticorpos monoclonais pembrolizumab e nivolumab.

O primeiro estudo clínico encontra-se na fase dois, onde a intervenção consiste no TMF, usando como dadores doentes com CCR que respondem à terapêutica anti-PD-I e como recetores doentes que não respondem.⁷² O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia do TMF como uma intervenção adjuvante para melhorar a resposta ao tratamento. Este estudo ainda está em curso e a aguardar resultados.⁷²

O segundo estudo clínico, encontra-se na fase um, que visa investigar o potencial do TMF em melhorar a eficácia da terapêutica anti-PD-I em doentes resistentes ao tratamento. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do TMF na resposta imune e na redução da resistência à terapia anti-PD-I.⁷³ Este estudo encontra-se numa fase inicial e procura fornecer perceções valiosas sobre a aplicação do TMF como uma abordagem terapêutica complementar.⁷³

5. Perspetivas Futuras do Transplante da Microbiota Intestinal

Em relação ao TMF, as perspetivas são bastante promissoras, é expectável que esta abordagem terapêutica continue a evoluir e o seu uso a expandir-se para o tratamento de diversas indicações clínicas. Atualmente, o TMF apenas está aprovado para ICD, no entanto, num futuro próximo espera-se o seu uso seja expandido para outras doenças intestinais, bem como transtornos metabólicos e doenças neurológicas.

O desenvolvimento de terapêuticas personalizadas, impulsionando uma compreensão detalhada da interação entre a microbiota e o hospedeiro, permitirá intervenções mais direcionadas e eficazes. Ao conhecermos o papel específico de cada espécie envolvida na MI, assim como dos metabolitos por elas produzidos, seremos capazes de direcionar intervenções terapêuticas de forma mais precisa e eficaz. Isso abrirá caminho para abordagens terapêuticas mais direcionadas e personalizadas, com o potencial de melhorar os resultados clínicos e a qualidade de vida dos doentes.

Além disso, é importante aprimorar a segurança e a padronização do TMF, estabelecendo diretrizes claras de triagem de dadores e implementando estratégias eficazes de redução de

patogênicos. Essas medidas visam garantir a qualidade e a segurança do material fecal utilizado no TMF.

A criação da microbiota sintética em laboratório representa uma promissora abordagem terapêutica, com potencial para reduzir os riscos associados aos doadores de matéria fecal. O desenvolvimento nesta área tem o objetivo de disponibilizar terapias mais acessíveis e seguras.⁷⁴ Ao criar microbiotas sintéticas em laboratório, é possível controlar e projetar comunidades microbianas com propriedades terapêuticas específicas, evitando assim a dependência de doadores externos. A microbiota sintética tem o potencial de fornecer uma opção terapêutica mais segura e amplamente disponível para o tratamento de diversas condições relacionadas com a disbiose.

Atualmente já se encontra a decorrer um projeto denominado “Microbiota Vault project”, que almeja criar um banco biológico global de amostras de fezes de tribos isoladas.⁷⁵ Essas amostras são armazenadas a 80 graus Celsius negativos, com o propósito de, no futuro, servirem como fonte de microrganismos benéficos para a saúde humana. Este projeto conta com colaborações em diversos países, incluindo Portugal, existindo a parceria com o Instituto Gulbenkian de Ciência.⁷⁵

6. Considerações Finais

A influência da MI e o uso do TMF representam uma área de pesquisa promissora no tratamento do CCR. Apesar da evolução do conhecimento sobre a composição e funções da MI, ainda há muitos aspectos que permanecem desconhecidos. Isso deve-se em parte à complexidade da MI com imprevisíveis interações com o ambiente, o hospedeiro e entre microrganismos.

A disbiose da MI, caracterizada por alterações na composição e função da MI, tem sido associada ao desenvolvimento do CCR. Nesse contexto, o TMF surge como uma estratégia terapêutica inovadora, capaz de restaurar a diversidade microbiana e restabelecer o equilíbrio da MI.

Estudos clínicos têm demonstrado resultados encorajadores, especialmente em relação ao uso do TMF em combinação com terapias convencionais, como a quimioterapia ou radioterapia. A modulação da MI com recurso ao TMF tem o potencial de melhorar a resposta terapêutica, reduzir os efeitos adversos e aumentar a sobrevivência dos doentes com CCR.

No entanto, apesar dos progressos, ainda há desafios que têm de ser superados. A segurança a longo prazo do TMF precisa de ser melhor compreendida, assim como a identificação e seleção adequada de doadores.

Em suma, a influência da MI e o TMF representam um campo em evolução no tratamento do CCR. À medida que a pesquisa continua a avançar, espera-se que esta abordagem terapêutica possa melhorar significativamente os resultados clínicos e a qualidade de vida dos doentes afetados por esta patologia.

Referências Bibliográficas

1. SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron - Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biology**. . ISSN 15457885. 14:8 (2016). doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
2. SEKIROV, Inna *et al.* - Gut Microbiota in Health and Disease. 2010). doi: 10.1152/physrev.00045.2009.-Gut.
3. VRIEZE, A. *et al.* - Fecal transplant: A safe and sustainable clinical therapy for restoring intestinal microbial balance in human disease? **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**. ISSN 15321916. 27:1 (2013) 127–137. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.003.
4. JANDHYALA, Sai Manasa *et al.* - Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**. ISSN 22192840. 21:29 (2015) 8836–8847. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.
5. BARKO, P. C. *et al.* - The Gastrointestinal Microbiome: A Review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. ISSN 19391676. 32:1 (2018) 9–25. doi: 10.1111/jvim.14875.
6. TULSTRUP, Monica Vera Lise *et al.* - Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. **PloS one**. . ISSN 1932-6203. 10:12 (2015). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0144854.
7. ANDERSON, James W. *et al.* - Health benefits of dietary fiber. **Nutrition Reviews**. . ISSN 00296643. 67:4 (2009) 188–205. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x.
8. SIVAPRAKASAM, Sathish *et al.* - Short-chain fatty acid transporters: Role in colonic homeostasis. **Comprehensive Physiology**. ISSN 20404603. 8:1 (2018) 299–314. doi: 10.1002/cphy.c170014.
9. LEBLANC, Jean Guy *et al.* - Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. **Current Opinion in Biotechnology**. ISSN 09581669. 24:2 (2013) 160–168. doi: 10.1016/j.copbio.2012.08.005.
10. CAPALDO, Christopher T.; POWELL, Domonica N.; KALMAN, Daniel - Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. **Journal of Molecular Medicine**. . ISSN 14321440. 95:9 (2017) 927–934. doi: 10.1007/s00109-017-1557-x.
11. HONDA, Kenya; LITTMAN, Dan R. - The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. **Nature**. ISSN 14764687. 535:7610 (2016) 75–84. doi: 10.1038/nature18848.

12. HOLLANDER, Daniel; KAUNITZ, Jonathan D. - The “Leaky Gut”: Tight Junctions but Loose Associations? **Digestive Diseases and Sciences**. . ISSN 15732568. 65:5 (2020) 1277–1287. doi: 10.1007/s10620-019-05777-2.
13. USUDA, Haruki; OKAMOTO, Takayuki; WADA, Koichiro - Leaky gut: Effect of dietary fiber and fats on microbiome and intestinal barrier. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 14220067. 22:14 (2021). doi: 10.3390/ijms22147613.
14. PAONE, Paola; CANI, Patrice D. - Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners? **Gut**. . ISSN 14683288. 69:12 (2020) 2232–2243. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322260.
15. KÖNIG, Julia *et al.* - Human intestinal barrier function in health and disease. **Clinical and Translational Gastroenterology**. ISSN 2155384X. 7:10 (2016). doi: 10.1038/ctg.2016.54.
16. COLEMAN, Olivia I.; HALLER, Dirk - Bacterial signaling at the intestinal epithelial interface in inflammation and cancer. **Frontiers in Immunology**. . ISSN 16643224. 8:JAN (2018). doi: 10.3389/fimmu.2017.01927.
17. LUO, Ying; SONG, Yuzhu - Mechanism of antimicrobial peptides: Antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 14220067. 22:21 (2021). doi: 10.3390/ijms222111401.
18. MORRISON, Douglas J.; PRESTON, Tom - Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**. . ISSN 19490984. 7:3 (2016) 189–200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
19. FRANZOSA, Eric A. *et al.* - Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 10916490. 112:22 (2015) E2930–E2938. doi: 10.1073/pnas.1423854112.
20. GILBERT, Jack A. *et al.* - Current understanding of the human microbiome. **Nature Medicine**. . ISSN 1546170X. 24:4 (2018) 392–400. doi: 10.1038/nm.4517.
21. HILLS, Ronald D. *et al.* - Gut microbiome: Profound implications for diet and disease. **Nutrients**. . ISSN 20726643. 11:7 (2019). doi: 10.3390/nu11071613.
22. TELLE-HANSEN, Vibeke H.; HOLVEN, Kirsten B.; ULVEN, Stine M. - Impact of a healthy dietary pattern on gut microbiota and systemic inflammation in humans. **Nutrients**. . ISSN 20726643. 10:11 (2018). doi: 10.3390/nu10111783.

23. DAVID, Lawrence A. *et al.* - Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**. . ISSN 00280836. 505:7484 (2014) 559–563. doi: 10.1038/nature12820.
24. NICHOLSON, Jeremy K. *et al.* - Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**. . ISSN 10959203. 336:6086 (2012) 1262–1267. doi: 10.1126/science.1223813.
25. PEDERSINI, Paolo; TURRONI, Silvia; VILLAFANE, Jorge Hugo - Gut microbiota and physical activity: Is there an evidence-based link? **Science of the Total Environment**. . ISSN 18791026. 727:2020). doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138648.
26. MATENCHUK, Brittany A.; MANDHANE, Piush J.; KOZYRSKYJ, Anita L. - Sleep, circadian rhythm, and gut microbiota. **Sleep Medicine Reviews**. . ISSN 15322955. 53:2020). doi: 10.1016/j.smr.2020.101340.
27. LEVY, Maayan *et al.* - Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**. . ISSN 14741741. 17:4 (2017) 219–232. doi: 10.1038/nri.2017.7.
28. YOON, Mi Young; YOON, Sang Sun - Disruption of the gut ecosystem by antibiotics. **Yonsei Medical Journal**. . ISSN 05135796. 59:1 (2018) 4–12. doi: 10.3349/ymj.2018.59.1.4.
29. GOMAA, Eman Zakaria - Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**.ISSN 15729699. 113:12 (2020) 2019–2040. doi: 10.1007/s10482-020-01474-7.
30. AMBALAM, Padma *et al.* - Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**. . ISSN 15321916. 30:1 (2016) 119–131. doi: 10.1016/j.bpg.2016.02.009.
31. GIBSON, Glenn R. *et al.* - Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. . ISSN 17595053. 14:8 (2017) 491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.
32. MENG, X. *et al.* - Gut dysbacteriosis and intestinal disease: mechanism and treatment. **Journal of Applied Microbiology**. . ISSN 13652672. 129:4 (2020) 787–805. doi: 10.1111/jam.14661.
33. NAVARRO, Mercedes *et al.* - Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update. **World Journal of Gastroenterology**. ISSN 22192840. 23:20 (2017) 3632–3642. doi: 10.3748/wjg.v23.i20.3632.
34. Portugal Source: Globocan Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site.

35. CENTELLES, Josep J. - General Aspects of Colorectal Cancer. **ISRN Oncology**. 2012:2012) 1–19. doi: 10.5402/2012/139268.
36. BHATT, Aadra P.; REDINBO, Matthew R.; BULTMAN, Scott J. - The role of the microbiome in cancer development and therapy. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. . ISSN 0007-9235. 67:4 (2017) 326–344. doi: 10.3322/caac.21398.
37. MOAZZEN, Sara *et al.* - Systematic review and meta-analysis of diet quality and colorectal cancer risk: is the evidence of sufficient quality to develop recommendations? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 15497852. 61:16 (2021) 2773–2782. doi: 10.1080/10408398.2020.1786353.
38. SUNG, Hyuna *et al.* - Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. . ISSN 0007-9235. 71:3 (2021) 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
39. KARSA, L. VON *et al.* - European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: Overview and introduction to the full Supplement publication. **Endoscopy**. . ISSN 0013726X. 45:1 (2013) 51–59. doi: 10.1055/s-0032-1325997.
40. **Rastreio do cancro colorretal – SNS** - [Consult. 30 jun. 2023]. Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2018/02/12/rastreio-do-cancro-colo-rectal/>>.
41. THAISS, Christoph A. *et al.* - The microbiome and innate immunity. **Nature**. . ISSN 14764687. 535:7610 (2016) 65–74. doi: 10.1038/nature18847.
42. WONG, Sunny H. *et al.* - Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. **Gastroenterology**. ISSN 15280012. 153:6 (2017) 1621-1633.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.022.
43. GAO, Zhiguang *et al.* - Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664302X. 6:FEB (2015). doi: 10.3389/fmicb.2015.00020.
44. GALLO, Antonella *et al.* - Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An uptodate. **World Journal of Gastroenterology**. . ISSN 22192840. 22:32 (2016) 7186–7202. doi: 10.3748/wjg.v22.i32.7186.
45. WU, Na *et al.* - Dysbiosis Signature of Fecal Microbiota in Colorectal Cancer Patients. **Microbial Ecology**. ISSN 00953628. 66:2 (2013) 462–470. doi: 10.1007/s00248-013-0245-9.

46. WONG, Sunny H. *et al.* - Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. **Gut**. . ISSN 14683288. 66:8 (2017) 1441–1448. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312766.
47. DING, Chenbo *et al.* - Intestinal microbiota: A novel perspective in colorectal cancer biotherapeutics. **OncoTargets and Therapy**. . ISSN 11786930. 11:2018) 4797–4810. doi: 10.2147/OTT.S170626.
48. BILLER, Leah H.; SCHRAG, Deborah - Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: A review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**. . ISSN 15383598. 325:7 (2021) 669–685. doi: 10.1001/jama.2021.0106.
49. XIE, Yuan Hong; CHEN, Ying Xuan; FANG, Jing Yuan - Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. . ISSN 20593635. 5:1 (2020). doi: 10.1038/s41392-020-0116-z.
50. YUAN, Lu *et al.* - The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-Fluorouracil treatment on colorectal cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. . ISSN 19506007. 108:2018) 184–193. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.165.
51. FERREIRA, Talita Mayra *et al.* - Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. **Lipids**. . ISSN 00244201. 47:7 (2012) 669–678. doi: 10.1007/s11745-012-3680-3.
52. WALLACE, Bret D. *et al.* - **Alleviating Cancer Drug Toxicity by Inhibiting a Bacterial Enzyme** Disponível em: www.sciencemag.org
53. LIN, Xiaoxi B. *et al.* - The role of intestinal microbiota in development of irinotecan toxicity and in toxicity reduction through dietary fibres in rats. **PLoS ONE**. . ISSN 19326203. 9:1 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0083644.
54. MIMA, Kosuke *et al.* - *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. **Gut**. . ISSN 14683288. 65:12 (2016) 1973–1980. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310101.
55. HE, Yao *et al.* - Gut microbial metabolites facilitate anticancer therapy efficacy by modulating cytotoxic CD8+ T cell immunity. **Cell Metabolism**. . ISSN 19327420. 33:5 (2021) 988-1000.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2021.03.002.

56. GERASSY-VAINBERG, Shiran *et al.* - Radiation induces proinflammatory dysbiosis: Transmission of inflammatory susceptibility by host cytokine induction. **Gut**. . ISSN 14683288. 67:1 (2018) 97–107. doi: 10.1136/gutjnl-2017-313789.
57. GANESH, Karuna *et al.* - Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. . ISSN 17595053. 16:6 (2019) 361–375. doi: 10.1038/s41575-019-0126-x.
58. FRANKEL, Arthur E. *et al.* - Cancer Immune Checkpoint Inhibitor Therapy and the Gut Microbiota. **Integrative Cancer Therapies**. ISSN 1552695X. 18:2019). doi: 10.1177/1534735419846379.
59. LI, Weina *et al.* - Gut microbiome and cancer immunotherapy. **Cancer Letters**. . ISSN 18727980. 447:2019) 41–47. doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.015.
60. YANG, Zhengyang *et al.* - Current progress and future perspectives of neoadjuvant anti-PD-1/PD-L1 therapy for colorectal cancer. **Frontiers in Immunology**. . ISSN 16643224. 13:2022). doi: 10.3389/fimmu.2022.1001444.
61. VÉTIZOU, Marie *et al.* - Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. **Science**. ISSN 10959203. 350:6264 (2015) 1079–1084. doi: 10.1126/science.aad1329.
62. KELLY, Colleen R. *et al.* - ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. **American Journal of Gastroenterology**. . ISSN 15720241. 116:6 (2021) 1124–1147. doi: 10.14309/ajg.0000000000001278.
63. CAMMAROTA, Giovanni *et al.* - European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. Em **Gut**. [S.l.] : BMJ Publishing Group, 1 Abr. 2017
64. WANG, Jiunn Wei *et al.* - Fecal microbiota transplantation: Review and update. **Journal of the Formosan Medical Association**. . ISSN 18760821. 118:2019) S23–S31. doi: 10.1016/j.jfma.2018.08.011.
65. **OpenBiome: Accelerating Discoveries in Microbiome Science** - [Consult. 30 ago. 2023]. Disponível em: <https://openbiome.org/>
66. TANG, Guihua; YIN, Wen; LIU, Wenen - Is frozen fecal microbiota transplantation as effective as fresh fecal microbiota transplantation in patients with recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection: A meta-analysis? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. . ISSN 18790070. 88:4 (2017) 322–329. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.007.

67. LEE, Christine H. *et al.* - Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent clostridium difficile infection a randomized clinical trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**. . ISSN 15383598. 315:2 (2016) 142–149. doi: 10.1001/jama.2015.18098.
68. ZHANG, Xueying *et al.* - Fecal microbiota transplantation: standardization or diversification? **Science China Life Sciences**. . ISSN 18691889. 62:12 (2019) 1714–1716. doi: 10.1007/s11427-019-1592-8.
69. **Important Safety Alert Regarding Use of Fecal Microbiota for Transplantation and Risk of Serious Adverse Reactions Due to Transmission of Multi-Drug Resistant Organisms | FDA** - [Consult. 11 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/important-safety-alert-regarding-use-fecal-microbiota-transplantation-and-risk-serious-adverse>
70. PERILLO, Federica *et al.* - Gut microbiota manipulation as a tool for colorectal cancer management: Recent advances in its use for therapeutic purposes. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 14220067. 21:15 (2020) 1–20. doi: 10.3390/ijms21155389.
71. CUI, Ming *et al.* - Faecal microbiota transplantation protects against radiation-induced toxicity. **EMBO Molecular Medicine**. . ISSN 1757-4676. 9:4 (2017) 448–461. doi: 10.15252/emmm.201606932.
72. **Fecal Microbiota Transplant and Re-introduction of Anti-PD-I Therapy (Pembrolizumab or Nivolumab) for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer in Anti-PD-I Non-responders - Full Text View - ClinicalTrials.gov** - [Consult. 30 ago. 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCCT04729322>
73. **Fecal Microbiota Transplant (FMT) Capsule for Improving the Efficacy of Anti- PD-I - Full Text View - ClinicalTrials.gov** - [Consult. 30 ago. 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04130763>
74. KHORUTS, Alexander; WEINGARDEN, Alexa R. - Emergence of fecal microbiota transplantation as an approach to repair disrupted microbial gut ecology. **Immunology Letters**. . ISSN 18790542. 162:2 (2014) 77–81. doi: 10.1016/j.imlet.2014.07.016.
75. **A vault for humanity | The Microbiota Vault** - [Consult. 30 ago. 2023]. Disponível em: <https://www.microbiotavault.org/>