

LUÍSA PEIXE “MICROBIOTA DO TRATO URINÁRIO TEM UM PAPEL CRUCIAL NA MANUTENÇÃO DO ESTADO DE SAÚDE”

Caraterizar detalhadamente a microbiota urinária feminina, através da metagenómica e culturómica, tem sido o trabalho desenvolvido por uma equipa de investigadores da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP), com o objetivo de encontrar marcadores (bacterianos ou outros) de uma microbiota equilibrada e em disbiose, bem como elucidar as propriedades bacterianas relevantes para a manutenção do estado de saúde. Em entrevista exclusiva ao *Jornal Médico*, a professora e investigadora Luísa Peixe esclarece a importância da microbiota urinária, salientando a necessidade de se aprofundar a função e potencial dos milhares de isolados identificados na investigação até aqui desenvolvida.

JORNAL MÉDICO (JM) | Qual a importância da microbiota urinária e o que levou a que a sua equipa desenvolvesse investigação nesta área?

LUÍSA PEIXA (LP) | A descoberta recente de uma microbiota urinária veio demonstrar que, ao contrário do que era genericamente aceite, a urina das pessoas saudáveis não é estéril. A microbiota – conjunto de todos os microrganismos que habitam um determinado local do nosso corpo – é importante para a fisiologia humana e desenvolvimento do sistema imunitário, podendo também participar em reações de digestão e desintoxicação.

Estima-se que a microbiota da bexiga de homens e mulheres tenha um papel crucial na manutenção do estado de saúde. Este papel parece decorrer, entre outros aspetos, da produção de neurotransmissores pelas bactérias que compõem a microbiota urinária, assim como da sua capacidade de inibir a instalação de patógenos através da competição para substratos, produção de compostos antimicrobianos ou constituindo uma barreira que bloqueia o acesso de patógenos ao uroepitélio. Por outro lado, as bactérias que compõem a microbiota urinária poderão ser uma importante determinante de patologias urinárias, tais como o síndrome da bexiga hiperativa. O conhecimento detalhado da composição e função dos membros da microbiota urinária em indivíduos saudáveis e com patologias urinárias é essencial para melhorar a prevenção, diagnóstico e



O grupo de investigação em microbiota urinária feminina inclui (na foto, da esquerda para a direita): **Magdalena Książek**, **Luísa Peixe**, **Svetlana Ugarcina Perovic** e **Joana Rocha**, contando com o apoio de outros membros do meu grupo de investigação e a colaboração de **Tiago Antunes** (Hospital de São João), **Natércia Teixeira** (Laboratório de Bioquímica da FFUP), **Paula Pinho** (Laboratório de Toxicologia da FFUP), **Anabela Cordeiro** (Laboratório de Microbiologia da FFUP) e **Helena Ramos** (Hospital Geral de Santo António)

seu tratamento. Dada a elevada prevalência e morbidade das patologias urinárias, avanços nesta área terão um impacto assinalável na saúde, bem como do ponto de vista socioeconómico.

A descrição recente de uma microbiota na bexiga oferece novas possibilidades de entender a etiologia de várias patologias urinárias, assim como a melhoria do seu diagnóstico e tratamento. Contudo, a elucidação do papel da microbiota urinária carece do domínio aprofundado do conhecimento em diversidade e comportamento bacteriano, quer numa perspetiva concetual, quer experimental.

O grupo de investigação que lidero acumulou, ao longo de mais de 20 anos, conhecimentos avançados em conceitos e metodologias que podem ajudar a esclarecer o papel da microbiota urinária, pelo que foi constituído um novo grupo que se dedica ao estudo detalhado da composição e função da microbiota urinária feminina, utilizando e melhorando metodologias culturais e não-culturais (metagenómica).

JM | Porque é que a diversidade da microbiota urinária (feminina) ainda é tão desconhecida?

LP | São ainda em número reduzido os estudos que reportam a diversidade microbiana de urinas de homens e mulheres, uma vez que os protocolos tradicionais culturais da urina são inadequados, sendo necessário o recurso a metodologias de maior expertise técnica, também morosas e dispendiosas. A demonstração da diversidade microbiana foi inicialmente efetuada em urinas colhidas na bexiga de homens e mulheres, através da metagenómica, uma metodologia em que é sequenciado o ADN bacteriano extraído diretamente da urina. Posteriormente, utilizando protocolos culturais alargados – uma maior quantidade de urina e diversas condições culturais – em combinação com métodos de identificação bacteriana de alto rendimento (MALDI-TOF MS) e capacidade de discriminação ao nível da infra-espécie (sequenciação de ADN) foi também possível verificar uma plethora de microrganismos na urina, confirmando definitivamente que as bactérias detetadas por sequenciação de ADN estavam, de facto, viáveis.

JM | Quais foram os objetivos e principais conclusões dos estudos levados a cabo pela vossa equipa de investigação neste âmbito? Que outras linhas de investigação, rastreio e/ou terapêutica podem encetar?

LP | O nosso grupo de investigação está a proceder a uma caracterização detalhada da microbiota urinária da mulher, utilizando metagenómica e culturómica, com o objetivo de encontrar marcadores (bacterianos ou outros) de uma microbiota equilibrada e em disbiose, assim como elucidar as propriedades bacterianas relevantes para a manutenção do estado de saúde. Durante este processo entusiasmante de revelação dos segredos do complexo ambiente do trato urinário da mulher temos analisado urinas colhidas de mulheres saudáveis, mulheres com infeções urinárias recorrentes e mulheres com síndrome da bexiga hiperativa.

Os nossos resultados, nesta fase, demonstram uma diversa e complexa microbiota urinária na mulher saudável (16-118 espécies diferentes por amostra), em que as espécies de *Lactobacillus* e *Corynebacterium* são habitualmente dominantes. Encontrámos ainda 39 géneros não reportados em estudos anteriores, sendo que a abundância relativa da Proteobacteria foi maior

Através de uma culturómica otimizada – meios de cultura otimizados submetidos a diferentes condições atmosféricas e utilização de maiores volumes de amostra – foi possível conhecer melhor a diversidade bacteriana urinária. A utilização do MALDI-TOF VITEK MS foi fundamental para, num curto espaço de tempo, identificarmos milhares de isolados cuja função e potencial serão agora explorados

nos nossos trabalhos e, pela primeira vez, detetámos *Tenericutes*. De salientar, as variações nas espécies e abundância relativa de *Lactobacillus* entre indivíduos saudáveis e com patologias, sendo actualmente objeto de estudo detalhado genómico e funcional. Adicionalmente, outros grupos bacterianos estão a ser detalhadamente caracterizados, de forma a identificar membros com um papel-chave na manutenção da saúde e de possível interesse para a terapêutica de patologias do trato urinário. Contudo, as diferenças interindividuais são o maior desafio desta estratégia bioterapêutica, tal como ocorre na reposição da microbiota em outros locais anatómicos: um *cocktail* microbiano urinário que é bom para um indivíduo, pode não ser efetivo noutra pessoa.

A integração dos dados microbiológicos com os bioquímicos, metabólicos e imunológicos poderá, numa fase mais avançada, proporcionar marcadores específicos para o diagnóstico de patologias associadas a disbiose urinária.

JM | Qual a importância das bactérias “boas” na microbiota urinária feminina?

LP | As bactérias “boas” que habitam o nosso trato urinário – usualmente referidas como comensais – podem ter vários papéis importantes na manutenção da homeostase do trato urinário. Por exemplo, trabalhos *in vitro* em curso no nosso grupo demonstraram que determinadas estirpes de *Lactobacillus* isoladas da urina de indivíduos saudáveis possuem uma potente atividade inibidora de bactérias “más”, designadamente contra estirpes uropatogénicas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. As bactérias “boas” podem ainda ser relevantes para a regulação e manutenção das junções epiteliais e no bloqueio do acesso dos patógenos ao uroepitélio. Menos ainda se conhece como as bactérias em comunidade interagem entre elas e com o uroepitélio.

JM | Quais as bactérias “más” mais prevalentes e quais as que mais preocupam?

LP | No nosso estudo de caracterização da microbiota urinária de mulheres jovens saudáveis, para além de espécies comensais (por exemplo, *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus jensenii*), detetámos a presença de espécies que são frequentes uropatógenos (por exemplo, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus saprophyticus*) e de espécies associadas a vaginose bacteriana (por exemplo, *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae*). A presença de bactérias “más” não significa necessariamente “nefasta” atividade, sendo necessários mais estudos para elucidar o seu potencial para o desenvolvimento de doença.

Adicionalmente verificámos também que mulheres com infeção urinária recorrente e síndrome da bexiga hiperativa apresentam diferenças nas comunidades bacterianas urinárias, quando comparadas com indivíduos saudáveis. Neste momento, desconhecemos se estas diferenças causam, contribuem ou são um sintoma. Esta é uma área de intensa pesquisa.

JM | Quais diria que são as vantagens da abordagem metagenómica na análise da microbiota urinária feminina, face aos métodos de cultura bacteriana?

LP | A identificação bacteriana por metagenómica é efetuada diretamente no ADN extraído da urina e, habitualmente, após amplificação e sequenciação do gene 16S rRNA. Este método permite detetar bactérias que não crescem nos meios de cultura, pelo que a diversidade de grupos bacterianos detetados por esta metodologia é significativamente maior do que pelos métodos culturais. Contudo, alguns grupos bacterianos podem não ser detetados por metagenómica, por insuficiência na extração do ADN ou na amplificação do gene 16S rRNA. Adicionalmente, com a utilização desta metodologia não temos acesso ao isolado de forma a explorar outras propriedades (por exemplo, patogenicidade e produção de compostos antimicrobianos) ou o perfil de resistência a antimicrobianos.

Com efeito, através de uma culturómica otimizada – meios de cultura otimizados submetidos a diferentes condições atmosféricas e utilização de maiores volumes de amostra – foi possível conhecer melhor a diversidade bacteriana urinária. A utilização do MALDI-TOF VITEK MS foi fundamental para, num curto espaço de tempo, identificarmos milhares de isolados cuja função e potencial serão agora explorados.