Kátia Galeão Brandt

Análise molecular da microbiota fecal de recém-nascidos saudáveis

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Orientadora: Magda Carneiro-Sampaio

Área de concentração: Pediatria

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Brandt, Kátia Galeão

Análise molecular da microbiota fecal de recém-nascidos saudáveis / Kátia Galeão Brandt. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Magda Carneiro-Sampaio.

Descritores: 1.Intestinos/microbiologia 2.Recém-nascido 3.Técnica de tipagem bacteriana 4.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/SBD-383/08

Dedicatória

À Deus, por Sua presença em minha vida.

Ao Prof Luiz Rachid Trabulsi, em quem surgiu
o sonho de ver esta pesquisa se realizar.

Agradecimentos

Ao meu pai, *Carlos Brandt*, cuja seriedade e paixão pela medicina e pela ciência me atraíram pelos mesmos caminhos. Se tantas vezes na vida sua ajuda me foi necessária, neste desafio ela foi vital.

Ao meu marido, *Felipe Santos*, por seu apoio e tolerância ilimitados, por seu incentivo e valorização, por ter física e emocionalmente assumido um pouco do meu lado mãe, tornando possível a conclusão deste trabalho.

Aos meus filhos, *Pedro* e *Gabriel*, que compreenderam meu afastamento e esperaram ansiosamente o fim desta pesquisa; por me terem nutrido de alegria.

À minha mãe, *Francesca*, por sempre ter acreditado, por seu apoio estratégico com as crianças e por suas intercessões em forma de orações.

Aos meus irmãos *Karla*, *Karina* e *Carlos*, pela segurança da certeza de que não importam os caminhos, e às vezes as distâncias, sempre teremos um ao outro.

À *Profa Magda Carneiro-Sampaio*, por me ter “presenteado” com este projeto, por ter compartilhado a segurança da sua experiência, Por não ter desistido frente aos obstáculos e principalmente por sempre ter posto, de maneira sincera e serena, a felicidade e a segurança da minha família à frente da vontade de ver esta pesquisa se concluir.

À *Profa Marina Martinez*, por ter tornado concreto o sonho do Prof Trabulsi, pela determinação e envolvimento, por não ter medido esforços para concluir esta pesquisa, pelo prazer de ter lhe conhecido e ter contado com sua orientação.

À *Profa Crala Taddei*, por ter operacionalizado esta pesquisa, por ter me apresentado ao fantástico mundo da biologia molecular, por sua tolerância com minha inexperiência, por sua prestativa orientação.

À *Elizabeth Harummy*, por seu competente envolvimento com esta pesquisa, pela sua capacidade intelectual executando as complexas análises estatísticas, pela também tolerância com meu pouco conhecimento de sua área.

À toda equipe do *Laboratório da Profa Marina Martinez*, tendo sido este um projeto adotado por todos.

À *Mariza*, por ter me nutrido com a literatura necessária, por me ter ajudado sempre com simpatia e presteza.

À equipe do *CSE Butantã*, que me acolheram e viabilizaram o acompanhamento das crianças, pelos ensinamentos adquiridos, pelo exemplar trabalho realizado, pela ajuda prestativa de todos, particularmente de *Dra Aparecida, Dra Jaqueline e Dra Fillumena*.

À *Márcia* que aceitou, com competência exemplar, a extenuante tarefa de concluir esta tese comigo.

À *Suzy* e *Jô* que assumiram com competência e envolvimento minha casa e meus filhos.

Às *mãe das crianças*, por terem se envolvido com a realização desta pesquisa, pelos bons relacionamentos vividos, agradeço a todas, mas em especial à *Ana Carolina, Maria de Fátima, Adriana e Fábria*.

“It takes a village to raise a child”

Provérbio africano

“O conhecimento não nos é dado.

É preciso encobri-lo por nós
mesmos, depois de uma viagem
que ninguém nos pode
poupar ou fazer por nós”.

Marcel Proust

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Microbiota intestinal	16
1.2 Métodos laboratoriais para estudo da microbiota fecal	25
2. MÉTODOS	30
2.1 Caracterização do estudo e amostragem	31
2.1.1 Local do estudo	31
2.1.2 Período do estudo	31
2.1.3 Tipo de estudo	31
2.1.4 Seleção – Tamanho da amostra	31
2.1.5 Critérios de inclusão	32
2.2 Procedimentos	32
2.2.1 Coleta do material fecal	32
2.2.2 Análise molecular da microbiota fecal	33
2.2.2.1 <i>Construção de biblioteca 16S rDNA</i>	33
2.2.2.2 <i>Pesquisa de bifidobactérias por Real-time PCR</i>	35
2.2.3 Apresentação dos dados	36
2.2.4 Acompanhamento das crianças e registro de informações	36
2.2.5 Considerações éticas	37
3. RESULTADOS	38
3.1 Dados relativos aos indivíduos	39
3.2 Dados relativos às bibliotecas 16S rDNA	41
3.2.1 Clonagem e seqüenciamento	41

3.2.2 Perfil bacteriano da microbiota fecal ao longo do primeiro mês de vida – Análise de tendência grupal	42
3.2.2.1 Biblioteca 16S rDNA do 2º dia de vida	42
3.2.2.2 Biblioteca 16S rDNA do 7º dia de vida	42
3.2.2.3 Biblioteca 16S rDNA do 30º dia de vida	44
3.3 Real-time PCR para bifidobactéria – tendência grupal	45
3.4 Perfil bacteriano da microbiota fecal ao longo do primeiro mês de vida – Análise individual após uso de antibiótico	45
3.4.1 Biblioteca 16S rDNA do 2º dia de vida – criança 3	45
3.4.2 Biblioteca 16S rDNA do 7º dia de vida	46
3.4.3 Biblioteca 16S rDNA do 30º dia de vida – criança 3	46
3.5 Real-time PCR para bifidobactéria – criança 3	48
4. DISCUSSÃO	49
4.1 Escolha do tema	50
4.2 Considerações sobre o grupo	50
4.3 Considerações metodológicas	51
4.4 Considerações sobre a análise dos dados	52
4.5 Comparação entre bibliotecas	53
4.6 Considerações sobre os principais grupos bacterianos	54
4.7 Uso de antibiótico em uma criança e as repercussões sobre a composição da microbiota	60
4.8 Possível impacto da composição da microbiota na imunomodulação do hospedeiro	62
5. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE	79
Apêndice 1. Formulário de consentimento livre e esclarecido	80
ANEXOS	82
Anexo 1. Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário – HU-USP	83
Anexo 2. Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP	84

Lista de Figuras

Figura 1	Curva de rarefação de cada biblioteca construída com as amostras de cada ponto de tempo.	41
Figura 2	Análise da distribuição dos gêneros bacterianos identificados nas bibliotecas 16S rDNA das amostras fecais de 9 recém-nascidos em cada ponto de tempo.	43
Figura 3	Análise da distribuição dos gêneros bacterianos identificados nas bibliotecas 16S rDNA das amostras fecais do 2º e 30º dias da criança número 3.	47

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados de idade gestacional materna (IG), peso ao nascimento, sexo e escore de Apgar das crianças ao nascimento.	39
Tabela 2	Dados sócio-econômicos das mães.	40
Tabela 3	Avaliações clínicas, dietéticas e ponderais das crianças com um mês de vida.	40
Tabela 4	Abundâncias relativas e frequências de colonização dos gêneros bacterianos observados nas amostras fecais de 9 crianças em cada ponto de tempo.	45
Tabela 5	Abundâncias relativas dos gêneros bacterianos observados nas amostras fecais do 2º e 30º da criança número 3.	47

Lista de Abreviaturas

ATB	antibiótico
CD	células dendríticas
CEGH	Estudos do Genoma Humano
CSE	Centro de Saúde Escola
DGGE / TGGE	<i>denaturing and temperature gradient gel electrophoresis</i>
DV	dias de vida
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
HU	Hospital Universitário
IG	idade gestacional
IgA	anticorpos imunoglobulina
PCR	reação de polimerização em cadeia
pH	potencial hidrogeniônico
RDP-II	<i>ribosomal database project II</i>
RNA	ácido ribonucleico
RN	recém-nascido
rRNA	ribosomal DNA
TH2	células TH2
T-RFLP	<i>terminal restriction fragment length polymorphism</i>
USP	Universidade de São Paulo

Resumo

Objetivo: Analisar através de metodologia molecular a microbiota fecal de recém-nascidos (RN) saudáveis, em aleitamento materno exclusivo. **Materiais e métodos:** Amostras fecais de dez RN foram avaliadas no 2º, 7º e 30º dias de vida (DV), através de sequenciamento do 16S rDNA bacteriano. *Real-time* PCR para bifidobacterias foi empregado nas amostras de 30 dias. **Resultados:** A diversidade bacteriana fecal aumentou do 2º para o 30º DV. *E. coli* predominou no 2º e 7º DV, e *Clostridium* no 30º DV. Usando *real-time* PCR, bifidobacterias foram identificadas em todas as amostras de 30 dias. **Conclusão:** Enterobacterias predominaram na primeira semana de vida. Aos 30 DV observou-se uma maior diversidade bacteriana, com predomínio de *Clostridium*.. A técnica inicial não permitiu identificar bifidobacterias.

Descritores: 1-Intestinos/microbiologia 2-Recém-nascido 3-Técnica de tipagem bacteriana 4-Reação em cadeia da polimerase.

Abstract

Purpose: To evaluate by molecular methodology the fecal microbiota of healthy newborns, exclusively breastfed. **Materials and methods:** Fecal samples from ten neonates were analyzed on 2nd, 7th and 30th day of life, using 16S rDNA sequencing and real-time PCR for bifidobacteria. **Results:** The fecal bacteria diversity increased from the second to the 30th day of life. *E. coli* was predominant in the fecal samples from the 2nd and 7th day of life, and *Clostridium* in the samples of the 30th day. Using real-time PCR bifidobacteria were identified in all 30th day samples. **Conclusion:** Enterobacteria were predominant in the first week of life. On 30th day of life a greater bacterial diversity was observed with predominance of *Clostridium*. The initial technique didn't allow the identification of bifidobacteria.

Keywords: 1-intestine/microbiology 2- Neonate 3- Bacterial typing technique 4- Polymerase chain reaction.

1. Introdução

1.1 Microbiota intestinal

Microbiota intestinal é definida com o conjunto de microorganismos que habita o trato gastrointestinal. O termo microflora, muitas vezes utilizado, foi instituído numa época em que esses organismos eram classificados como plantas¹.

Os micróbios que residem no trato gastrointestinal têm uma relação de mutualismo com o hospedeiro. Os microorganismos se beneficiam de um ambiente protegido onde existe um suprimento rico e contínuo de nutrientes; em retorno, eles desempenham funções vitais para o hospedeiro².

Mais do que sua simples existência, é preciso que haja um equilíbrio entre as bactérias e o hospedeiro³. Desequilíbrios na composição desta microbiota ou na relação desta com o hospedeiro são relacionados a danos imediatos⁴ ou tardios à saúde do hospedeiro⁵. Evidências sugerem particularmente a importância da microbiota no desenvolvimento imunológico do indivíduo, e relacionam distúrbios na sua composição com o desequilíbrio do sistema imune⁶.

O período neonatal é visto como uma época crítica⁷, onde ocorre o processo de instalação desta microbiota, que dependerá da inter-relação de muitos e complexos eventos, resultando em uma comunidade bacteriana permanente, que irá interagir continuamente com o hospedeiro, desempenhando funções fundamentais, de maneira mais ou menos adequada⁸.

Embora as bactérias possam ser encontradas em todo trato gastrointestinal, elas não se distribuem de forma homogênea. No estômago e no intestino delgado, o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação das bactérias e a população bacteriana é pequena, isso ocorre, principalmente, devido à ação bactericida das secreções intestinais (ácido gástrico, bile, secreções pancreáticas) e do intenso peristaltismo nessas regiões. O íleo já é considerado uma zona de transição bacteriológica, entre a escassa população bacteriana

do jejuno e do duodeno, e a densa flora do cólon. No cólon, as bactérias encontram uma condição favorável para sua proliferação devido à ausência de secreções intestinais, peristaltismo lento e abundante suprimento nutricional. A população microbiana do cólon alcançaria a magnitude de 10^{10} a 10^{12} organismos por grama de conteúdo luminal, podendo-se assim dizer que, existem mais micróbios no trato gastrointestinal do que células eucarióticas em todo corpo humano⁹.

É descrito ainda uma distribuição radial das bactérias dentro de cada compartimento intestinal. Existiriam populações bacterianas habitando o lúmen intestinal, outras dentro da camada de muco que recobre o epitélio intestinal, e outras aderidas às células epiteliais². Têm-se pouco conhecimento sobre a composição destas comunidades bacterianas e não se tem clareza das diferenças entre elas. Esta distribuição radial das bactérias não é aceita por todos os autores¹⁰. Existem poucos estudos avaliando a composição bacteriana da mucosa intestinal, certamente em função da dificuldade de se obter espécimes (biópsias intestinais através de endoscopia) que representem adequadamente a composição da microbiota da mucosa tal qual ela se encontra *in situ* (o processamento ao qual são submetidas as biópsias de mucosa intestinal alterariam grandemente as características da microbiota)².

Entre os poucos estudos que comparam microbiotas relacionadas à mucosa intestinal com microbiotas fecais os resultantes parecem ser conflitantes. Delgado et al¹¹, descreveram grandes semelhanças entre a composição bacteriana de amostras fecais e de mucosa, pelo menos no que se refere às espécies predominantes. Já Zoetendal et al¹², observaram uma distribuição homogênea de grupos bacterianos ao longo da mucosa colônica, mas que diferiam da composição bacteriana encontrada nas fezes.

Os mecanismos através dos quais os micróbios se associam ao trato gastrointestinal também não estão esclarecidos. Tal mecanismo é particularmente intrigante em vista da fisiologia dinâmica da mucosa intestinal. A mucosa, formada pelo epitélio intestinal e pela

camada de muco que reveste o mesmo, encontra-se em alterações constantes: movimentação constante de fluídos, reposição epitelial, motilidade das vilosidades e peristaltismo¹³.

A comunidade bacteriana residente no trato gastrointestinal pode ser vista em seu conjunto como um órgão, desempenhando importantes funções no organismo humano⁹. Ela tem um papel fundamental na proteção ecológica do hospedeiro, impedindo o estabelecimento das bactérias patogênicas. Este fenômeno é conhecido como “resistência à colonização” ou “efeito barreira”. As bactérias residentes ocupam os nichos de colonização disponíveis, inviabilizando a permanência de outros microorganismos. Esse impedimento à colonização também ocorreria por outros mecanismos como competição pelos nutrientes disponíveis no meio, produção de um ambiente fisiologicamente restritivo (por exemplo, alteração do pH ou produção de metabólitos tóxicos) e produção *in vivo* de substâncias com ação antimicrobianas¹⁴.

Uma das principais funções atribuídas à microbiota é a sua função imunomoduladora. Este efeito imunomodulador é particularmente importante no início da vida. Ao nascimento, o sistema imunológico do recém-nascido é imaturo. Evidências indicam que a interação da microbiota com o sistema imune intestinal é mandatória para o desenvolvimento e regulação do sistema imunológico¹⁵.

As evidências mais concretas da importância inquestionável da microbiota intestinal para o desenvolvimento do sistema imune vêm dos estudos realizados nos animais *germfree*. Nestes animais isentos de bactérias, observou-se, entre outros achados, que a mucosa intestinal apresentava baixa densidade de células linfóides, as Placas de Peyer eram pequenas e pouco numerosas e que era baixa a concentração das imunoglobulinas circulantes. Após a colonização destes animais por micróbios, os linfócitos intraepiteliais se expandiram, centros germinativos com células produtoras de imunoglobulinas rapidamente proliferaram nas Placas

de Peyer e na lâmina própria, e a concentração de imunoglobulinas circulantes aumentou no soro¹⁶.

Novamente em relação à importância da microbiota para a regulação do sistema imune, os estudos em animais *germfree* deixam provas contundentes. Sudo et al⁷, submeteram ratos *germfree* no período neonatal à ingestão de ovalbumina como antígeno alergênico, tendo havido uma resposta do tipo alérgica. A reconstituição desta flora com *Bifidobacterium infantis* restaurou a capacidade de indução da tolerância oral; entretanto isto só foi efetivo quando a reconstituição foi realizada no período neonatal, mas não em animais mais velhos. Conforme se vê, aparentemente existe um período crítico onde a estimulação microbiana do trato gastrointestinal seria capaz de moldar o sistema imune, talvez de maneira permanente.

Está claro que, alterações imunes de órgãos e células ocorrerão na ausência da microbiota, mas o mecanismo através do qual a microbiota interfere na regulação do sistema imune ainda não está totalmente esclarecido apesar das muitas descobertas recentes.

Fazendo uma breve revisão sobre o processo de regulação do sistema imunológico temos que, ao nascimento o bebê tem um sistema imunológico polarizado no sentido TH2, condição que lhe foi necessária intra-útero para não haver rejeição entre mãe e o feto. Após o nascimento, vários fatores vão influenciar a regulação do sistema imunológico, de forma que deve ocorrer uma repressão dessa dominância TH2 pré-existente. Se isso não ocorrer, um fenótipo alérgico irá se desenvolver¹⁷.

Exposição às bactérias através da mucosa intestinal está entre os fatores reguladores deste mecanismo. Estudos com uso de bactérias probióticas sugerem a capacidade de alguns grupos bacterianos de modificar o futuro imune de indivíduos. Em um estudo randomizado, controlado com placebo, de 159 crianças de alto risco para desenvolver atopia foi demonstrado que a administração perinatal de bactéria probiótica (*Lactobacillus* GG) reduziu em metade o desenvolvimento de eczema atópico durante os dois primeiros anos de vida¹⁸. A

análise destes indivíduos aos quatro anos de idade ainda apontou para um efeito imunomodulador benéfico da estimulação precoce por bactérias probióticas, sugerindo que esta adequada estimulação precoce tem um efeito duradouro¹⁹.

A teoria da higiene proposta por Strachan²⁰ em 1989 sugere que o aumento das doenças alérgicas nos países desenvolvidos tenha ocorrido por diminuição dos estímulos microbianos no começo da vida. Atribui este fato às práticas de higiene mais rigorosas instituídas naqueles países. Embora a teoria da higiene continue sendo aventada até hoje não foi possível comprová-la²¹.

Sugere-se que a exposição bacteriana precoce seja capaz de desviar o sistema imune da predominância TH2, mas exatamente como isto é orquestrado dentro da mucosa intestinal não se tem certeza¹⁷. Evidências apontam para o papel fundamental da interação das células dendríticas (CD) presentes na mucosa intestinal, com os diferentes tipos bacterianos. Sabe-se que a CD desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imune. Dependendo do tipo de estímulo bacteriano que ative a CD, ela irá desenvolver diferentes sinais de instrução, que induzirão de diferentes formas a diferenciação das células T primitivas para células TH1, TH2 ou Treg¹⁷.

Sabe-se que as células Treg agem suprimindo a função efetora de outras células imunes, em particular da célula T. Elas têm um papel importante na homeostase imune, prevenindo doenças autoimunes e alérgicas¹⁷. Células Treg podem ser induzidas por ativações específicas de CDs. Estudos *in vitro* já demonstraram que determinados tipos bacterianos, ativando de forma específica a CD são capazes de induzir o desenvolvimento de células Treg²².

Diferentes tipos bacterianos ativariam de forma diferenciada a CD. No estudo de Young et al²³, demonstraram que, tipos específicos de bifidobactérias, predominantes em amostras fecais de crianças pertencentes a diferentes países (Gana, Nova Zelândia e Reino

Unido), ativaram de forma diferenciada as CDs. Sendo que as bifidobacterias que predominaram na Nova Zelândia e no Reino Unido induziram resposta da CD no sentido TH2 enquanto as de Gana induziram uma resposta no sentido da tolerância imunológica. Os autores sugerem este mecanismo como forma de explicar a teoria da higiene.

O desafio é compreender como todo esse processo ocorre *in vivo* e qual seria o resultado da interação com tantos tipos bacterianos diferentes. Stagg et al²⁴, sugerem que a atividade de uma população de CD num determinado sítio anatômico pode depender do balanço dos sinais microbianos além de outros sinais ambientais. O conhecimento a respeito dessas interações ainda é confuso.

Além de sua atuação através da CD, sabe-se ainda que os micróbios intestinais estimulam a maturação das células B produtoras de IgA presentes no intestino. A IgA secretória constitui uma primeira linha de defesa contra antígenos estranhos nas membranas mucosas²⁵. Após o nascimento existem poucas células B produtoras de IgA. Uma resposta imune clara e importante ocorre logo após o nascimento, sendo produzidas IgAs contra antígenos bacterianos presentes na microbiota intestinal. Localmente essa IgA será secretada na luz intestinal onde irá se aderir aos antígenos bacterianos, impedindo que eles penetrem a mucosa, auxiliando na sua exclusão, possivelmente exercendo um certo controle sobre a comunidade bacteriana intestinal. Elas ainda ganharão a corrente sanguínea e poderão ser encontradas em outras mucosas, onde irão auxiliar no processo de defesa²⁶.

Uma terceira função atribuída à microbiota intestinal estaria relacionada à sua contribuição para a nutrição e metabolismo do hospedeiro^{27,28}. A ação das bactérias intestinais, sobre determinados nutrientes, permite um maior aproveitamento nutricional. Substratos que chegam ao lúmen colônico não digeridos, principalmente carboidratos, são fermentados, formando-se produtos ácidos que são reabsorvidos pela mucosa colônica, ocorrendo o chamado salvamento energético. Neste processo são formados os ácidos graxos

de cadeia curta, principal fonte de energia dos colonócitos, tendo efeito trófico no epitélio intestinal²⁹.

Estudos recentes destacam que a microbiota tem grande influência no reaproveitamento energético dos alimentos e no depósito de gordura no organismo e sugerem sua relação com a obesidade³⁰.

Esta importante massa funcional precisa se estabelecer e se estruturar dentro do indivíduo humano, o processo de implantação deste ecossistema tem início ao nascimento. Dentro do útero os recém-nascidos são estéreis. Logo durante o nascimento, bactérias da mãe e posteriormente do meio ambiente irão colonizá-los. O recém-nascido terá então uma coleção heterogênea de bactérias proliferando no seu trato gastrointestinal e através de mecanismos reguladores internos (fatores relacionados ao hospedeiro e às bactérias) e externos (alimentação, tipo de parto ou contaminação ambiental), haverá uma seleção, permitindo a persistência de algumas populações bacterianas, mas eliminando outras. Em torno de dois anos de idade, a composição da microbiota se tornará estável, sendo alcançada a comunidade clímax ou microbiota tipo adulto⁹. A partir deste período, embora a microbiota intestinal permaneça em interação permanente com microorganismos do meio ambiente, sua composição se mantém estável³¹.

Vários fatores atuarão em conjunto moldando o processo de instalação da microbiota intestinal, de forma que um fator poderá influenciar ou alterar o efeito do outro, somente de forma didática eles podem ser analisados individualmente¹³.

Estudos sugerem que a seleção bacteriana inicial dentro do trato gastrointestinal possa ser influenciada pela genética³²⁻³⁴. Existe a hipótese de que o padrão dos sítios de adesão bacteriana dentro do trato gastrointestinal seria influenciado pela genética do indivíduo³². Estudos já demonstraram que existe uma semelhança estatisticamente maior entre

o padrão da microbiota de gêmeos idênticos, do que entre irmãos não gêmeos ou gêmeos fraternos^{33,34}.

É possível ainda que o hospedeiro possa exercer um efeito regulador sobre a microbiota através do seu sistema imune. É possível que a IgA secretória aja como mediador desta seleção bacteriana²⁶.

Evidências recente sugerem uma ação reguladora da bactéria sobre o hospedeiro, induzindo respostas fisiológicas do seu interesse. Foi demonstrada a capacidade de “diálogo” entre as bactérias e as células do hospedeiro. As bactérias residentes podem mandar “mensagens” para as células do hospedeiro modificando a expressão ou a atividade dos sítios de adesão³⁵. Este processo de “comunicação bacteriana” é chamado de “quorum sensing”. Através deste mecanismo as bactérias podem induzir alterações ambientais que favoreçam a sua permanência. Assim, determinadas espécies bacterianas poderiam interferir na colonização, ao alterar a fisiologia do hospedeiro³⁵.

O modo de nascer irá interferir no padrão de colonização inicial da microbiota. A microbiota da criança que nasce por parto vaginal é derivada inicialmente da microbiota vaginal e fecal materna, que contamina o bebê durante o parto. Mais tarde a criança adquire bactérias presentes nos alimentos e no meio ambiente. Na criança que nasce por meio de parto cesariano, não há participação da microbiota materna e o meio ambiente torna-se a fonte inicial de contaminação³⁶.

O desenvolvimento da microbiota intestinal será grandemente influenciado pelo tipo de alimentação oferecida ao bebê nos primeiros meses de vida. Descreve-se que a microbiota das crianças em aleitamento materno é rapidamente dominada por bifidobactérias enquanto ocorre a redução de espécies bacterianas potencialmente patogênicas. Em contraste, crianças em uso de fórmulas artificiais desenvolvem uma microbiota mais diversa, composta não só de bifidobactérias como também de *Bacteroides*, *Enterobactérias*, *Enterococos* e *Clostridium*²⁸.

Vários fatores presentes no leite materno podem interferir na composição da microbiota. Constituintes imunológicos como a IgA secretória teriam a capacidade de inibir microorganismos patogênicos. A indução de um pH intestinal reduzido favoreceria o crescimento das bifidobactérias, que são mais tolerantes ao ácido. A menor concentração de ferro existente no leite materno é desfavorável ao crescimento de algumas bactérias (como bacteróides e enterobactérias). Em contraste, por não necessitar de ferro para proliferar as bifidobactérias não são prejudicadas. Finalmente existem os fatores *bifidi* (uma família de oligossacarídeos), presentes em quantidade elevada somente nas secreções lácteas humanas. Estes oligossacarídeos são utilizados preferencialmente pelas bifidobactérias favorecendo o seu crescimento³⁷.

O grau de contaminação ambiental ou de carga bacteriana no ambiente parece ser um fator diferencial no processo de colonização intestinal sendo descritas diferenças nítidas entre a microbiota de crianças nascidas em países com melhores condições sócio-econômicas, daquelas nascidas em países com condições sócio-econômicas mais precárias³⁸. São escassos os trabalhos existentes descrevendo o perfil da microbiota de crianças residentes em países menos favorecidos, sujeitas a um meio ambiente mais contaminado. Nos poucos estudos existentes observou-se que as crianças são mais colonizadas por microorganismos potencialmente patogênicos é que os eventos microbianos ocorrem numa maior velocidade^{38,39}.

Alguns fatores externos teriam a capacidade de modificar a estrutura pré-existente da microbiota, um destes seria os antimicrobianos. Os antimicrobianos exercem um efeito negativo sobre a estrutura ecológica já estabelecida. Observou-se que após seu uso ocorre uma supressão significativa de várias populações bacterianas dentro da microbiota e que alguns microorganismos potencialmente patogênicos, por serem mais resistentes ao seu efeito,

tendem a proliferar^{40,41}. Essas alterações podem ser nocivas ao hospedeiro; quadros diarréicos, por vezes graves, podem ocorrer em consequência deste desequilíbrio⁴.

1.2 Métodos laboratoriais para estudo da microbiota fecal

Em vista da importância da microbiota e buscando conhecer os eventos relacionados a esta, muitos já tentaram estudá-la. A complexidade deste ecossistema, principalmente no que se refere a sua dependência estrita de anaerobiose dificultou os estudos iniciais⁴².

O primeiro passo dado no sentido de viabilizar o estudo das bactérias intestinais foi o desenvolvimento de técnicas de cultivo anaeróbio, as quais permitiram que bactérias anaeróbias, predominantes no trato gastrointestinal, pudessem ser cultivadas fora do seu habitat natural. Com o uso dessa tecnologia, estudos sobre a composição da microbiota fecal começaram a ser publicados na década de 80⁴².

Percebeu-se, entretanto, que o uso dessa tecnologia não oferecia uma informação real sobre a composição bacteriana das amostras fecais. A falha residia no fato de nem todos os componentes bacterianos da microbiota poderem ser cultivados. Os pesquisadores constataram que a contagem microscópica total das células bacterianas na lâmina era sempre superior à contagem total de células viáveis obtidas após cultura em meio não-seletivo. Tendo em vista estas dificuldades, foi estimado que, mesmo empregando adequados métodos bacteriológicos, apenas 40% da microbiota fecal seria cultivável em meio não-seletivo⁴².

Para contornar essas limitações, seria necessário o uso de métodos de identificação bacteriana que não fossem dependentes do crescimento das mesmas em meios de cultura.

Com o descobrimento de que o RNA da pequena subunidade ribossomal, chamado 16S rRNA, estava presente em todas as células bacterianas, e ainda que, suas seqüências de

nucleotídeos poderiam ser utilizadas para classificação bacteriana, disseminou-se a aplicação do uso de métodos moleculares baseados no estudo do 16S rRNA para estudo de comunidades bacterianas complexas, incluindo o trato gastrointestinal⁴³.

O 16S rRNA está contido dentro do ribossomo procarioto. Dentro das várias regiões do 16S rRNA, ele possui regiões altamente conservadas, presentes em todos os organismos bacterianos, e regiões altamente variáveis, que são únicas a um determinado grupo de organismos, permitindo a identificação filogenética da bactéria⁴⁴. Várias técnicas moleculares, baseadas no uso do 16S rRNA foram desenvolvidas.

A escolha de um método molecular, em particular, a ser utilizado, depende do objetivo do estudo, da questão que se deseja abordar. Para todos os métodos se descrevem indicações e limitações.

Quadro 1. Usos e limitações dos principais métodos moleculares para estudo da microbiota fecal.

Métodos	Usos	Limitações
<i>Denaturing and Temperature gradient gel electrophoresis</i> (DGGE / TGGE)	Monitoramento de comunidades bacterianas; permite análise comparativa rápida.	Sujeito aos vieses do PCR; semi-quantitativo; inicialmente não identifica os tipos bacterianos; para identificação requer biblioteca de clones.
<i>Terminal restriction fragment length polymorphism</i> (T-RFLP)	Monitoramento de comunidades bacterianas; permite análise comparativa rápida.	Sujeito aos vieses do PCR; semi-quantitativo; inicialmente não identifica os tipos bacterianos; para identificação requer biblioteca de clones.
<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (FISH)	Detecção e quantificação bacteriana.	Pesquisa de seqüências específicas; requer conhecimento prévio das seqüências; laborioso em nível de espécie.
<i>Dot-blot hybridization</i>	Detecção e estimativa da abundância relativa.	Pesquisa de seqüências específicas; requer conhecimento prévio das seqüências; laborioso em nível de espécie.
<i>Real time PCR</i>	Quantificação bacteriana.	Pesquisa de seqüências específicas; requer conhecimento prévio das seqüências; laborioso.
Biblioteca 16S rDNA	Inventário da comunidade bacteriana.	Laborioso; sujeito aos vieses do PCR.

(Adaptado de Tannok⁴² e Zoedental et al.⁴³)

O método de construção de biblioteca de 16S rDNA foi utilizado inicialmente para o estudo de comunidades bacterianas complexas presentes em vários ecossistemas, como sedimentos marinhos e solos, sendo considerada uma estratégia eficaz⁴³. A partir destes, os pesquisadores adaptaram a técnica para o estudo da microbiota fecal. Desde 1999 ele vem sendo utilizado com esse objetivo⁴⁵. Através da construção de bibliotecas 16S rDNA, o investigador tem a chance de poder identificar todos os componentes bacterianos de uma amostra, independente da fragilidade do microrganismo fora do seu habitat natural. Por este método, não se favorece a identificação de determinado grupo bacteriano (como ocorre, por exemplo, com o uso de meios seletivos de cultura), não se faz também uma busca ativa de grupos bacterianos específicos (como acontece com outros métodos moleculares), se permite que todos os microorganismos da amostra sejam, potencialmente, representados na biblioteca.

Hayashi et al.⁴⁶, um dos primeiros estudiosos a utilizar biblioteca 16S rDNA para estudo da microbiota, analisou a microbiota de um indivíduo através deste método e de cultura. Embora várias novas espécies tenham sido detectadas através da construção da biblioteca de 16S rDNA, ele observou que a proporção das populações bacterianas predominantes, guardava grande semelhança com os resultados obtidos através de cultura.

Por motivos práticos o estudo é feito do gene da molécula do DNA bacteriano que codifica o 16S rRNA, chamado 16S rDNA. Esse DNA é extraído da amostra fecal e será amplificado em uma reação de polimerização em cadeia (PCR). Ao final da reação de PCR serão obtidas cópias do 16S rDNA proporcionalmente representativas dos diferentes grupos bacterianos presentes na amostra (aplicons). Esses aplicons são então submetidos a uma etapa de clonagem de forma que ao final do processo será obtida uma biblioteca de clones do 16S rDNA bacteriano da amostra inicial. Estes clones serão então seqüenciados, e as seqüências identificadas⁴⁷.

Está claro que a microbiota intestinal é de fundamental importância para a saúde do ser humano. Muito embora tenha despertado interesse científico há décadas, estudos ainda são necessários para melhor conhecê-la. No indivíduo adulto a comunidade bacteriana tende a ser estável, não sendo possível interferir na sua composição, sendo assim, maior atenção deve ser dada ao período de sua instalação. A instalação desse ecossistema tem início logo após o nascimento e será moldado por vários fatores ainda não totalmente compreendidos. Os tipos microbianos que colonizam inicialmente o trato gastrointestinal têm provável importância particular, uma vez que influenciarão as subseqüentes seleções microbianas e exercerão os primeiros estímulos ao sistema imune intestinal, potencialmente podendo exercer um efeito regulador sobre o mesmo. O período neonatal, portanto, se configura um período crítico para a composição da microbiota e para o sistema imune, ficando justificada a importância de estudos que busquem conhecer melhor os eventos que ocorrem neste período.

O grau de contaminação ambiental possivelmente interfere na composição da microbiota, a repercussão deste fato ainda não está clara. Existem poucos estudos sobre a microbiota de crianças em países em desenvolvimento e não existe estudo sobre a composição da microbiota intestinal de recém-nascidos no Brasil. As lacunas nestes conhecimentos reforçam a importância do estudo.

Novas técnicas moleculares estão sendo usadas para estudo de comunidades bacterianas complexas, a utilização destas técnicas possibilita obter informações mais acuradas sobre os eventos microbianos do trato gastrointestinal. A construção de biblioteca 16S rDNA como metodologia escolhida para o estudo é justificada pelo objetivo de analisar a biodiversidade dos constituintes bacterianos das amostras.

O objetivo deste estudo foi analisar, usando metodologia molecular, a microbiota fecal de um grupo de recém-nascidos saudáveis, em aleitamento materno exclusivo, nascidos no Brasil; apresentando eventuais intercorrências que possam ter impacto sobre a composição bacteriana intestinal neste período.

2. Métodos

2.1 Caracterização do estudo e amostragem

2.1.1 Local do estudo

O recrutamento inicial dos indivíduos para pesquisa foi realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP). As mães foram abordadas para pesquisa nas primeiras 24 horas após o parto, no Alojamento Conjunto do HU. Todas as amostras fecais iniciais (segundo dia de vida) foram colhidas no alojamento conjunto.

As análises microbiológicas das amostras colhidas (no HU e no domicílio) foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP.

As crianças foram acompanhadas no Centro de Saúde Escola (CSE) Butantan.

2.1.2 Período do estudo

A coleta das amostras fecais e o acompanhamento das crianças transcorreram entre junho e novembro de 2007.

2.1.3 Tipo de estudo

O estudo foi do tipo descritivo, longitudinal, sendo realizada uma coorte de um grupo de recém-nascidos saudáveis, analisados quanto ao perfil da microbiota intestinal, a partir do nascimento, além dos fatores colonizadores externos.

2.1.4 Seleção – *Tamanho da amostra*

Foram estudados dez recém-nascidos. Esta amostragem pequena, de conveniência, foi imposta pela técnica laboriosa e alto custo da metodologia molecular empregada. O tamanho da amostra está compatível com outros estudos publicados com metodologia semelhante⁴⁸⁻⁵².

2.1.5 Critérios de inclusão

Relativos à mãe

- ❖ Mãe saudável não sendo diagnosticada doença associada;
- ❖ Realização de acompanhamento pré-natal adequado. Só foram incluídas mães que fizeram acompanhamento pré-natal no CSE Butantan, tendo realizado no mínimo três consultas;
- ❖ Não ocorrência de processo infeccioso significativo. Só foram incluídas mães cujo rastreamento infeccioso pré-natal foi normal;
- ❖ Não uso de antibiótico no último mês de gestação.

Relativos ao recém-nascido

- ❖ Recém-nascidos a termo, caracterizado como idade gestacional entre 37 e 42 semanas de gestação;
- ❖ Nascimento através de parto vaginal;
- ❖ Peso adequado ao nascimento caracterizado como peso entre 2.500 a 4.000g ao nascimento;
- ❖ Boa vitalidade ao nascer foi caracterizada como Apgar ≥ 8 no 5º minuto;
- ❖ Aleitamento materno exclusivo instituído a partir do nascimento até o final do primeiro mês de vida.

2.2 Procedimentos

2.2.1 Coleta do material fecal

Três amostras fecais foram colhidas. A primeira foi colhida no 2º dia de vida, ainda no Alojamento Conjunto do HU, pela pesquisadora. A segunda e a terceira amostras foram colhidas com 7 e 30 dias de vida, no domicílio, pela genitora. As amostras fecais foram colhidas após uma evacuação recém emitida, diretamente das fraldas e acondicionadas em

recipientes plásticos estéreis contendo cerca de 30 ml de solução TE (10 μ M Tris-HCl, 0,1 μ M EDTA, pH 7,6). As mães receberam um recipiente estéril contendo TE e uma colher padronizada, e foram cuidadosamente orientadas sobre a adequada coleta do material.

A primeira amostra (2º dia de vida), colhida pela pesquisadora no HU, foi levada imediatamente para o laboratório sendo acondicionada no freezer (-20º) até o processamento.

Duas consultas médicas (com 7 e 30 dias de vida) foram agendadas pra a criança após a alta do HU e as coletas fecais foram programadas para a mesma data. As mães foram orientadas a colher o material no mesmo dia da consulta e manter o mesmo na geladeira (4º) até a ida para o serviço de saúde. Após o recebimento do material no serviço de saúde o mesmo era acondicionado no freezer (-20º) até o processamento.

2.2.2 Análise molecular da microbiota fecal

2.2.2.1 Construção de biblioteca 16S rDNA

Extração do DNA – o DNA bacteriano foi extraído do material fecal utilizando o kit para isolamento de DNA genômico bacteriano de amostras de fezes QIAmp DNA Stool Mini (QIAGEN Canadá), segundo instruções do fabricante. O DNA extraído foi mantido a -20°C até o momento do uso;

Amplificação da região 16S rRNA do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) – O DNA extraído das amostras foi utilizado como molde na reação em cadeia da polimerase para amplificação da região codificadora do gene 16S rRNA. As reações de foram realizadas usando o seguinte programa: 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94º por 45 segundos, 62°C pó 1 min, 68°C por 2 minutos, e um período de extensão final de 68°C por 10 min. Foram utilizados iniciadores universais para organismos procariotos do domínio Bactéria

conforme proposto por Hayashi et al.⁴⁶. Os iniciadores utilizados foram 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492R(5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3').

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 100µl contendo 180ng de DNA extraído das amostras fecais. As condições de reação do PCR foram as mesmas propostas por Hayashi et al.⁴⁶. Os amplicons de 16S rDNA amplificados foram purificados utilizando o kit UltraClean PCR (Invitrogen) e estocado a -20°C até o momento do uso;

Clonagem da biblioteca 16S rDNA – Os amplicons purificados de cada amostra foram ligados em um plasmídeo vetor pCR[®]2.1 TOPO e, então, transformados em bactérias competentes *E. coli*, utilizando o kit Original TA Cloning (Invitrogen). O lisado bacteriano de cada colônia de *E. coli* transformada foi utilizado como DNA molde em uma nova reação de amplificação do DNA. Nesta reação, foram utilizados iniciadores M13, fornecidos no kit de clonagem;

Seqüenciamento de DNA e análise filogenética – Os amplicons obtidos como descrito no item anterior foram purificados e submetidos ao Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), ligado ao Instituto de Biociências da USP para serem seqüenciados;

Análise estatística dos dados filogenéticos – As seqüências de nucleotídeos foram analisadas pelo programa FASTA de busca e combinação de seqüências do *Ribosomal Database Project II* (RDP-II)⁵³. Todas as seqüências foram examinadas para possíveis artefatos pelo programa CHECK CHIMERA do programa RDP II⁵³. As seqüências foram alinhadas pelo programa CLUSTAL W⁵⁴ e corrigidas por inspeção manual. As seqüências foram assim comparadas com seqüências 16S rDNA existentes no banco de genes GenBank do NCBI. As seqüências com mais de 97% de similaridade foram designadas como sendo do mesmo gênero.

Uma OTU foi definida como o conjunto de clones cujas seqüências apresentaram pelo menos 97% de similaridade em relação aos outros membros do seu grupo. O número de OTUs presente na amostra foi determinado pelo programa DOTUR (Distance based OTU and richness determination)⁵⁵.

Para estimar a representatividade da amostragem e avaliar a diversidade encontrada em cada biblioteca construída foram construídas curvas de rarefação utilizando o programa DOTUR⁵⁵.

Para avaliar a diferença estatística entre as bibliotecas de clones representantes dos três pontos de análises fecais (2º, 7º e 30º dias de vida) foi utilizado o programa J-LIBSHUFF⁵⁶. O programa J-LIBSHUFF analisou a taxa de cobertura de cada biblioteca construída.

2.2.2.2 Pesquisa de bifidobactérias por Real-time PCR

Devido a não detecção de bifidobactérias nas amostras fecais analisadas, uma reação de Real-time PCR usando iniciadores específicos para *Bifidobacterium ssp.* foi conduzida nas amostras fecais do 30º dia de vida. Os iniciadores e a sonda utilizados foram os descritos e validados por Penders et al.⁵⁷. A reação de amplificação foi conduzida em um volume total de 50µl contendo 1xTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 300 nmol/L de ambos os iniciadores, 150 nmol/L da sonda Taq/man e 0,2 ng do DNA alvo purificado. Reações e amplificação foram realizadas usando o programa: 50º C por 2 minutos, 95º C por 10 minutos e 42 ciclos de 95º C por 15 segundos e 60º C por 2 minutos. A detecção foi conduzida em sistema de detecção de seqüências *Applied Biosystems Prism 700* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A quantidade de bifidobactéria expressa como log₁₀ unidades formadoras de colônias (CFU) por grama de fezes, foi calculada para cada amostra fecal do 30º dia de vida a partir do valor limite do ciclo, usando curvas padrão construídas.

2.2.3 Apresentação dos dados

A abundância relativa de cada gênero bacteriano identificado foi calculada como o percentual de seqüências obtidas, para aquele determinado gênero bacteriano, em relação ao número total de seqüências obtidas em cada ponto do estudo.

Os dados relativos às seqüências de cada biblioteca de 9 recém-nascidos foram agrupados em um gráfico para análise de tendência grupal.

A frequência de colonização foi calculada como o percentual de recém-nascidos, dentro do grupo, nos quais foi detectado o gênero específico.

As bibliotecas de um recém-nascido (número 3) foram analisadas separadamente, uma vez que este indivíduo foi o único que fez uso de antibiótico no primeiro mês de vida.

A quantificação das bifidobactérias para as amostras de 30 dias foi expressa como a média e a variação no grupo (composto por 9 crianças), sendo descrito a quantificação da criança número 3 (que fez uso de antibiótico) separadamente.

2.2.4 Acompanhamento das crianças e registro de informações

As crianças foram acompanhadas pela pesquisadora a partir do nascimento, até o primeiro mês de vida no CSE Butantan.

No engajamento da criança à pesquisa foram registradas informações sobre o pré-natal, condições de nascimento, estrutura familiar e de moradia, assim como outros dados sobre as condições sócio-econômicas da família. Nas consultas pediátricas foram registradas informações referentes ao crescimento pondero-estatural, à alimentação, ocorrência de intercorrências infecciosas e ao uso de medicações.

2.2.5 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HU (Anexos 1 e 2). Todas as mães assinaram termos de consentimento livre e esclarecido para participação na pesquisa (Apêndice 1).

3. Resultados

3.1 Dados relativos aos indivíduos

As crianças nasceram com idade gestacional calculada por Capurro entre 37semanas e 3 dias e 41 semanas e 6 dias (Média $\pm$ DP – 39,6 $\pm$ 1,6 semanas). O peso observado variou entre 2.725g e 3.560g (Média $\pm$ DP – 3.328,5 $\pm$ 387,6g). Quanto ao sexo, 60% dos indivíduos eram do sexo masculino, 40% do sexo feminino. Quanto ao escore de vitalidade de Apgar, todas as crianças apresentaram Apgar de 10 aos 5 minutos de vida. Tabela 1.

Tabela 1. Dados de idade gestacional materna (IG), peso ao nascimento, sexo e escore de Apgar das crianças ao nascimento.

Criança	IG (Capurro)	Peso ao nascimento	Sexo	Apgar
1	40sem 5d	3.560g	Feminino	10/10/10
2	40sem 1d	2.870g	Feminino	9/10/10
3	41sem 1d	2.765g	Feminino	10/10/10
4	41sem 6d	3.725g	Masculino	10/10/10
5	37sem 6d	3.030g	Masculino	10/10/10
6	39sem 3d	3.300g	Feminino	9/10/10
7	37sem 3d	3.210g	Masculino	10/10/10
8	40sem	3.290g	Masculino	8/10/10
9	40sem 6d	3.520g	Masculino	9/10/10
10	38sem 1d	4.015g	Masculino	10/10/10

As mães apresentavam idades entre 16 e 39 anos. Quanto à escolaridade, 30% possuíam 1º incompleto, 30% 2º grau incompleto e 40% 2º grau completo. Quanto ao vínculo empregatício, 60% das mães não possuíam emprego, 20% possuíam empregos informais e 20% trabalhavam com carteira assinada. Caracterizando as condições sócio-econômicas observa-se que 40% das famílias habitavam em favela e possuíam renda mensal entre um e dois salários mínimos, 60% não eram moradoras de favela e tinham renda familiar entre 2,5 a 5 salários mínimos (tabela 2).

Tabela 2. Dados sócio-econômicos das mães.

Criança	Idade mat	Escolaridade	Ocupação	Favela	Renda Familiar
1	16	1º ano 2º grau	Estudante	Não	5SM
2	32	1º ano 2º grau	Do lar	Sim	2SM
3	36	4º ano 1º grau	Do lar	Sim	1 ½ SM
4	39	3º ano 2º grau	Func. Públ.	Não	3SM
5	24	3º ano 2º grau	Aux. Limp.	Sim	1SM
6	29	1º ano 2º grau	Do lar	Não	2 ½ SM
7	29	3º ano 2º grau	Do lar	Não	*
8	25	5º ano 1º grau	Diarista	Sim	1SM
9	24	3º ano 2º grau	Do lar	Não	2 ½ SM
10	22	8º ano 1º grau	Feirante	Não	*

*Não quis/soube informar a renda.

Na consulta de um mês de vida todas as crianças tinham apresentado ganho ponderal satisfatório, com exceção da criança de número 3. Todas as crianças permaneciam em aleitamento materno exclusivo. A criança número três fez uso de antibiótico com sete dias de vida para tratamento de provável impetigo. A criança de número 4 apresentou conjuntivite purulenta na primeira semana de vida (tabela 3).

Tabela 3. Avaliações clínicas, dietéticas e ponderais das crianças com um mês de vida.

Criança	Ganho de peso	Alimentação	Antibiótico	Intercorrência
1	Adequado	Materno exclu	Não	Não
2	Adequado	Materno exclu	Não	Não
3	Insuficiente	Materno exclu	Sim*	Impetigo
4	Adequado	Materno exclu	Não	Conjuntivite
12	Adequado	Materno exclu	Não	Não
13	Adequado	Materno exclu	Não	Não
14	Adequado	Materno exclu	Não	IVAS
15	Adequado	Materno exclu	Não	Não
16	Adequado	Materno exclu	Não	Candidíase perineal
17	Adequado	Materno exclu	Não	Não

* Cefalexina e Acyclovir via oral, com 7 dias de vida, para tratamento de lesões bolhosas.

3.2 Dados relativos às bibliotecas 16S rDNA

3.2.1 Clonagem e seqüenciamento

A partir de 1.560 clones das bibliotecas 16S rRNA construídas, com seqüências contendo aproximadamente 450pd a partir da extremidade 5' do gene 16S rRNA foram agrupadas. Após excluir as seqüências de baixa qualidade ou estruturas quiméricas, e de acordo com a fórmula de Good, a taxa de cobertura das bibliotecas variou de 97,1% a 100%. A curva de rarefação (fig. 1) mostra o número de seqüências obtidas e os números de OTUs essas seqüências representaram quando um critério de similaridade de 97% foi usado. A diversidade estimada para cada ponto da biblioteca foi estatisticamente diferente. A biblioteca construída com as amostras de 30 dias mostrou a maior diversidade. A biblioteca construída com as amostras do 7º dia mostrou a menor diversidade.

Figura 1. Curva de rarefação de cada biblioteca construída com as amostras de cada ponto de tempo.

3.2.2 Perfil bacteriano da microbiota fecal ao longo do primeiro mês de vida - Análise de tendência grupal

3.2.2.1 Biblioteca 16S rDNA do 2º dia de vida

As seqüências obtidas das amostras fecais de 8 recém-nascidos colhidas no 2º dia de vida foram agrupadas para análise (tab. 1) (fig. 2). Este perfil bacteriano inicial se mostrou simples, observando-se uma grande predominância de *E. coli*. Assim, este grupo filogenético representou 65% das seqüências obtidas e foi identificado em todos os recém-nascidos (frequência de colonização de 100%). Os restantes dos grupos identificados representaram menores proporções. Outros anaeróbios facultativos observados foram outras enterobactérias gram-negativas: *Enterobacter* (abundância relativa de e frequência de colonização de 37%) e *Citrobacter* (abundância relativa de 2% e frequência de colonização de 12%) e cocos Gram-positivos: *Streptococcus* (abundância relativa de 8% e frequência de colonização de 62%) e *Staphylococcus* em pequenas proporções (abundância relativa de 2% e frequência de colonização de 12%). Anaeróbios estritos foram identificados em menores proporções: *Bacteroides* (abundância relativa de 12% e frequência de colonização de 37%) e *Clostridium* (abundância relativa de 3% e frequência de colonização de 37%). Grupos filogenéticos menos representados foram: *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Leuconostoc*, e *Veillonella*. A análise fecal de um recém nascido não foi possível de ser realizada devido à insuficiência de material.

3.2.2.2 Biblioteca 16S rDNA do 7º dia de vida

As seqüências obtidas das amostras fecais de nove recém-nascidos colhidas no 7º dia de vida foram agrupadas para análise (tab. 1) (fig 2). Observa-se que *E coli* se tornou menos preponderante, mas ainda correspondeu ao maior número de seqüências, sendo responsável por 49% das seqüências obtidas e ocorrendo em 78% dos recém-nascidos. Outras

enterobactérias (*Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*) foram observadas em recém-nascidos individuais em baixas proporções. O *Streptococcus* foi identificado em proporções pouco maiores que o *Staphylococcus* (frequência de colonização de 56% contra 33%) com abundâncias relativas semelhantes (10% contra 11%). Quanto ao componente anaeróbio: *Bacteroides* e *Clostridium* tiveram pouca expressão, identificados ambos em 22% dos recém-nascidos, com abundâncias relativas baixas de 3% e 2%; *Veillonella* foi mais representativo nesta biblioteca (abundância relativa de 16% e frequência de colonização de 44%). Os *Lactobacillus*, também anaeróbios, puderam ser identificados em poucas sequencias (abundância relative de 3%) sendo identificados nas fezes de 22% dos recém-nascidos. Outros gêneros bacterianos menos identificados foram: *Acinetobacter baumannii* e *Parabacteroides*.

Figura 2. Análise da distribuição dos gêneros bacterianos identificados nas bibliotecas 16S rDNA das amostras fecais de 9 recém-nascidos em cada ponto de tempo.

3.2.2.3 Biblioteca 16S rDNA do 30º dia de vida

As seqüências obtidas das amostras fecais de nove recém-nascidos, colhidas no 30º dia de vida, foram agrupadas para análise (Tab.4; Fig 2). No perfil global desta biblioteca, observa-se que ocorre uma distribuição mais proporcional das abundâncias. *Clostridium* e não *E. coli* predominou discretamente sobre os demais grupos bacterianos identificados nesta biblioteca. *E. coli* ainda representou um grupo bacteriano importante, apresentando abundância relativa de 30%, sendo identificado em 66% dos recém-nascidos. *Clostridium*, por sua vez, correspondeu a 33% das seqüências sendo identificado em 60% dos indivíduos. Quanto ao grupo das enterobactérias, a *Klebsiella* foi identificada em número maior de indivíduos 44%, mas com abundância relativa baixa de 2%; *Enterobacter* foi detectado em 22% dos recém-nascidos com abundância relativa baixa de 1%. *Streptococcus* pôde ser identificado em 44% dos recém-nascidos com abundância relativa de 6% mas seqüências relativas ao *Staphylococcus* não foram identificadas nas análises de 30 dias. O componente anaeróbio dominou neste ponto de análise (no total, responsável por 58% das seqüências). Afora o *Clostridium*, *Bacteroides* foi detectado em 33% dos recém-nascidos com abundância relativa de 12%; *Veillonella* teve uma menor expressão que na biblioteca anterior sendo detectada em 44% dos indivíduos com abundância relativa de 8%; *Lactobacillus* se tornou um pouco mais representativo observado em 33% dos recém-nascidos com abundância relativa de 5%. Outros microorganismos que puderam ser identificados foram: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter*, *Enterococcus* e *Prevotella*.

Tabela 4. Abundâncias relativas e frequências de colonização dos gêneros bacterianos observados nas amostras fecais de 9 crianças em cada ponto de tempo.

Gêneros bacterianos	2º dia			7º dia			30º dia		
	FC*		AR**	FC		AR	FC		AR
	n=8	%	%	n=9	%	%	n=9	%	%
<i>Bacteroides</i>	3	37	12	2	22	3	3	33	12
<i>Citrobacter</i>	1	12	2	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium</i>	3	37	3	2	22	2	5	55	33
<i>E. Coli</i>	8	100	64	7	78	49	6	66	30
<i>Enterobacter</i>	3	37	7	1	11	1	2	22	1
<i>Klebsiella</i>	0	0	0	2	22	2	4	44	2
<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	2	22	3	3	33	5
<i>Staphylococcus</i>	1	12	2	3	33	10	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	5	62	8	5	56	11	4	44	6
<i>Veillonella</i>	3	37	1	4	44	16	4	44	8
Outros	2	25	1	4	44	3	-	-	2

*FC=frequência de colonização

**AR=abundância relativa

3.3 Real-time PCR para bifidobactéria – tendência grupal

Em todas as amostras fecais dos nove recém-nascidos agrupados para análise foram identificadas bifidobactérias. A quantificação revelou níveis populacionais que variaram de 7,60 a 12,26 log₁₀ UFC, media de 10,9 log₁₀ UFC.

3.4 Perfil bacteriano da microbiota fecal ao longo do primeiro mês de vida -

Análise individual após uso de antibiótico

3.4.1 Biblioteca 16S rDNA do 2º dia de vida – criança 3

O perfil bacteriano da biblioteca construída com as seqüências obtidas de amostra fecal da criança número 3 no 2º dia de vida mostra um padrão de distribuição semelhante ao observado para o restante do grupo (Tabela 5; Figura 3). *E. coli* predominou tendo sido este grupo filogenético identificado em 67% das seqüências (proporção semelhante à identificada na análise grupal que foi de 64%). Quanto ao componente anaeróbio, também se observa a

comparabilidade dos eventos, os *Bacteroides*, que representou o principal componente anaeróbio da análise global do 2º dia de vida, aqui também desempenhou este papel, identificado, porém, em proporções superiores às vistas na análise grupal, 25% (contra 12% observado no grupo); outro anaeróbio identificado nesta biblioteca foi o *Parabacteroide* atribuído a 3% das seqüências. Da amostra fecal desta criança foram obtidas 3% de seqüências correspondentes a um grupo de microorganismos que não havia sido anteriormente identificado por meio de cultura e cujas seqüências, quando depositadas no banco de genes não puderam ser atribuídas a nenhum outro grupo filogenético descrito dentro do banco.

3.4.2 Biblioteca 16S rDNA do 7º dia de vida

A amostra fecal deste ponto de tempo não foi colhida pela mãe.

3.4.3 Biblioteca 16S rDNA do 30º dia de vida – criança 3

Analizando o perfil bacteriano da amostra colhida no 30º dia de vida, observam-se eventos bacterianos que destoam da tendência descrita para o grupo (Tab. 5 Fig. 3). *E. coli* teve seu nível populacional proporcionalmente mais reduzido, sendo então atribuídas, a estes microorganismos, apenas 4% das seqüências enquanto na análise grupal a abundância relativa encontrada, nas análises de 30 dias, foi de 30% (7,5 vezes maior). Por sua vez, *Klebsiella* foi responsável por grande proporção das seqüências obtidas, de forma que foi identificada em quantidade relativa 14 vezes maior do que a evidenciada na análise grupal (28% contra 2%). O componente anaeróbio não representou a maior proporção das seqüências, atribuído a 35% das seqüências contra 58% observado no grupo. O principal anaeróbio identificado foi o *Bacteroides* com 19% de abundância relativa; *Clostridium*, que não havia sido identificado na amostra do 2º dia de vida, na análise fecal de 30 dias pôde ser identificado, embora com abundância relativa abaixo da encontrada no grupo (7% contra 33%). O grupo dos não

cultivados apresentou tendência de crescimento, sendo encontrado neste ponto atribuído a 23% das seqüências.

Tabela 5. Abundâncias relativas dos gêneros bacterianos observados nas amostras fecais do 2º e 30º da criança número 3.

Gêneros bacterianos	2º dia	30º dia
<i>Bacteroides</i>	25%	19%
<i>Clostridium</i>	0%	7%
<i>E. coli</i>	67%	4%
<i>Enterobacter</i>	0%	7%
<i>Klebsiella</i>	0%	28%
Não Cultivados	5%	23%
<i>Parabacteroides</i>	3%	4%
<i>Veillonella</i>	0%	7%

Figura 3. Análise da distribuição dos gêneros bacterianos identificados nas bibliotecas 16S rDNA das amostras fecais do 2º e 30º dias da criança número 3.

3.5 Real-time PCR para bifidobactéria – criança 3

Bifidobactérias foram identificadas na amostra de 30 dias desta criança, encontrando-se em nível populacional de $9,8 \log_{10}$ UFC, nível um pouco inferior à média observada para o grupo, mas dentro do intervalo de valores observado ($7,60$ a $12,26 \log_{10}$ UFC).

4. Discussão

4.1 Escolha do tema

Tendo em vista a importância da microbiota para o ser humano é de grande interesse conhecer adequadamente a mesma e os processos que regulam a sua instalação. Há algumas décadas pesquisadores tentam estudar a microbiota intestinal e se deparam principalmente com as dificuldades técnicas para o estudo da mesma. A complexidade deste ecossistema torna o desafio maior. A microbiologia clássica não foi capaz de descrever de forma acurada o ecossistema intestinal. O advento do uso das técnicas moleculares para a análise das comunidades bacterianas fecais, permitiu ao pesquisador se aproximar de um conhecimento mais realista deste ecossistema.

4.2 Considerações sobre o grupo

A tentativa, ao se definir os critérios de inclusão, era descrever os eventos ocorridos em um grupo homogêneo de crianças. Imaginamos que, dentro do possível, isto foi obtido. As crianças nasceram sob condições semelhantes e foram submetidas a eventos colonizadores externos semelhantes (mesma condição de saúde inicial, mesma forma de nascer, mesmo ambiente e cuidados hospitalares, e mesma alimentação inicial). Quanto à interferência do meio ambiente na colonização, o grupo apresenta uma pequena diferença de condição sócio-econômica. Um grupo ainda mais desfavorecido que o outro, já que moravam em favela e tinham menor renda familiar. Tal variável não foi possível controlar de forma mais homogênea, entretanto, após concluir a análise de todos os indivíduos, não observamos nenhum evento microbiológico que pudéssemos associar de forma diferenciada a este grupo, de forma que não acreditamos que esta pequena diferença tenha tido um impacto colonizador diferencial.

4.3 Considerações metodológicas

Usando o método proposto nesta investigação foi possível se delinear o perfil da microbiota fecal desse grupo de indivíduos. Os achados se assemelham aos dados descritos na literatura para populações semelhantes, conforme será visto no transcorrer da discussão e dão suporte a assertiva da capacidade do método em refletir os acontecimentos microbiológicos intestinais vividos pelos indivíduos.

É preciso, mais uma vez, destacar que se trata de uma metodologia inovadora que veio para suprir deficiências encontradas nos estudos sobre microbiota intestinal usando meios de cultivo (o qual pode favorecer o crescimento de determinados grupos bacterianos ou prevenir o crescimento de outros). Muitas importantes informações podem ser adquiridas com o uso dessa metodologia e devem ser analisadas, como todas as informações laboratoriais, levando em conta os limites do método.

A principal limitação do método foi a incapacidade de detectar grupos de bifidobacterias. A ausência destes microorganismos nas amostras fecais destes bebês em aleitamento materno levantou a suspeita de uma incapacidade do método de detectar as mesmas. Uma pesquisa utilizando real-time PCR constatou a ocorrência de bifidobactérias em todos os indivíduos.

A razão da não amplificação das bifidobactérias nas amostras estaria relacionada a possível viés associado às metodologias PCR dependentes⁵⁸. Uma provável explicação seria o casamento inadequado do iniciador universal com as seqüências das bifidobactérias, impossibilitando a reação de amplificação⁵⁹. Uma escolha judiciosa do iniciador foi feita tendo sido escolhido um iniciador universal cuja eficácia em amplificar o 16S rDNA bacteriano já havia sido previamente validado^{45,46}. Entretanto, é descrito que não existe um iniciador perfeito⁵⁹. Outra possível explicação estaria relacionada ao elevado conteúdo de C+G das seqüências das bifidobactérias; o que impediria a etapa de desnaturação adequada do

DNA de forma a permitir a amplificação⁵⁸. Em outras pesquisas realizadas, usando biblioteca 16S rDNA não foram identificadas bifidobactérias, tendo os autores atribuído este fenômeno a real ausência de bifidobactérias das amostras^{45,46,48}, é possível que esta metodologia não seja adequada para a análise de bifidobactérias.

4.4 Considerações sobre a análise dos dados

Por se tratar de uma amostra pequena e em função do fato dos dados não serem expressos em valores absolutos, análise estatística dos fenômenos observados não foi possível.

Para comparar os resultados encontrados nesta pesquisa com outros já publicados algumas considerações devem ser feitas. Existem duas gerações de dados sobre composição de microbiota. Uma era inicial, onde afloraram muitos estudos sobre instalação de microbiota, tendo sido a composição bacteriana das fezes avaliada por meio de cultura^{38,60-65} e uma nova era⁹, iniciada mais recentemente, onde voltaram a ser publicados artigos sobre o tema, agora utilizando os métodos moleculares, sendo poucos os que descrevem o processo de instalação bacteriana no período neonatal^{48,50,51,66}. Além do mais, certamente por conta do alto custo da metodologia, nesses estudos foram analisadas populações menores de indivíduos. Portanto, apesar dos diferentes métodos de investigação, comparações com os estudos iniciais, cultura dependentes, serão necessárias.

Outro fato que precisa ser levado em conta na discussão deste estudo é que foi analisado um conjunto de dados no qual está faltando um grupo bacteriano, as bifidobactérias. Para interpretar os resultados é preciso fazer o exercício de analisar as informações percebendo que estes microorganismos coexistem com os demais grupos bacterianos da biblioteca.

4.5 Comparação entre bibliotecas

Utilizando-se o programa DOTUR, as seqüências correspondentes às bibliotecas construídas em cada ponto de tempo foram analisadas estatisticamente. A curva de rarefação construída permite comparar as bibliotecas construídas em cada ponto de tempo quanto à sua diversidade. Maior diversidade ocorreu na amostra de 30 dias e menor diversidade na amostra do 7º dia de vida.

Este aumento de complexidade representada pela maior diversidade encontrada na biblioteca de 30 dias é descrito na literatura, as crianças devem desenvolver uma microbiota cada vez mais complexa até alcançarem um padrão de microbiota tipo adulto. Outros estudos moleculares analisando o processo de instalação da microbiota em crianças descrevem comunidades bacterianas mais simples inicialmente, e aumento da diversidade bacteriana ao longo dos primeiros meses de vida^{48,67}.

No estudo de Kurakawa et al⁶⁸, os autores realizaram estudo comparativo de amostras fecais de indivíduos adultos e crianças de diferentes idades, através de análise metagenômica. Foi observado que a microbiota fecal dos bebês nos primeiros meses de vida era mais simples e mostrava altas variações inter-pessoais, já nos adultos e crianças maiores era mais complexas e também mais estável.

No gráfico de análise grupal (fig. 3) observa-se que dentro do perfil bacteriano construído correspondente às análises do 2º dia de vida, o grupo filogenético com maior representação é o que corresponde à *E.coli* (bactéria aeróbia facultativa) tendo sido atribuídas a estas 64% das seqüências obtidas. Os microorganismos anaeróbios foram identificados em apenas 15% das seqüências, nesse ponto representados principalmente pelos *Bacteroides*. No perfil bacteriano relativo às amostras de 30 dias, as bactérias anaeróbias passam a predominar sendo responsáveis por 58% das seqüências, representadas principalmente pelo *Clostridium*, mas também por *Bacteroides*, *Veillonella* e *Lactobacillus*.

Este padrão de sucessão bacteriana pode ser comparado com o que é descrito na literatura clássica, onde é relatado que as bactérias aeróbias facultativas, *E. coli* principalmente, e também *Streptococcus* e *Staphylococcus*, são os primeiros colonizadores do trato gastrointestinal⁶⁹⁻⁷¹. Descreve-se que esses primeiros microorganismos consumiriam o oxigênio residual, presente no interior do intestino, favorecendo o ambiente para a instalação das bactérias anaeróbias, que após alguns dias passam a ser predominantes⁶⁹⁻⁷¹.

A análise do perfil da microbiota construído através de biblioteca 16S rDNA permitiu observar a evolução de declínio dos grupos aeróbios e ascensão dos anaeróbios.

4.6 Considerações sobre os principais grupos bacterianos

O grupo de organismos bacterianos identificados como *E.coli* se destacou enquanto componente numeroso da microbiota nas análises fecais realizadas ao longo do primeiro mês de vida neste grupo de indivíduos. Foi identificado em quantidades relativas elevadas dentro de cada ponto da análise, principalmente no segundo dia de vida, e também apresentou elevada frequência de colonização (100%, 78% e 66%) (tab. 4).

As altas taxas de colonização por *E. coli*, principalmente logo após o parto, foram descritas praticamente de forma unânime pelos primeiros estudos que analisaram a instalação da microbiota em recém-nascidos, tendo sido observadas em diferentes países do mundo^{60-62,64}.

Os estudos de Adlerberth et al^{38,72}, sugeriram que as taxas de colonização por *E. coli* haviam reduzido nos países em desenvolvimento, possivelmente em função de práticas mais rigorosas de higiene. Em estudo realizado em 1991 os autores compararam o padrão de colonização de crianças suíças com crianças paquistanesas e observaram que as crianças paquistanesas eram mais rapidamente colonizadas por enterobactérias e ainda, que essa colonização se dava em níveis populacionais mais altos³⁸. Num estudo subsequente,

Adlerberth et al.³⁹ constataram que as crianças paquistanesas apresentavam um elevado *turnover* de espécies de *E.coli*, tendo sido identificadas cerca de 8,5 diferentes espécies de *E. coli* na microbiota de cada criança, durante seis meses de acompanhamento, fato que contrastou com a taxa observada em crianças suíças, apenas 1,5 espécies em 6 meses⁷³. Tal fenômeno foi associado a menor exposição das crianças Suíças a contaminantes ambientais e a maior exposição ambiental das crianças paquistanesas.

Em 2006 Adlerberth et al.⁷² publicaram trabalho onde analisaram o padrão de colonização de 99 crianças suíças nascidas de parto normal e ressaltaram que as taxas de colonização por *E. coli*, nessa população de crianças, havia diminuído em relação à análise anterior e que o agente colonizador inicial deste grupo seria o *Staphylococcus*.

No estudo de Mah et al.⁷⁴. 2008, os autores compararam, utilizando meios de cultura, o padrão da microbiota de crianças nascidas no centro de Singapura (melhor condição sócio-econômica) com crianças de uma região rural da Tailândia (precárias condições sócio-econômicas) e observaram maiores taxas de colonização por *E. coli* nas últimas. Em outro estudo realizado em recém-nascidos na região central de Singapura, as taxas de colonização por *E. coli* foram avaliadas através de real-time PCR tendo sido quantificado baixos níveis populacionais de *E. coli* nessas crianças e baixa frequência de colonização⁷⁵.

Tal redução de colonização por *E. coli* não foi observada no estudo de Penders et al.⁷⁶, que investigou as taxas de colonização de várias bactérias através de real-time PCR em um grupo de 1.032 crianças holandesas com um mês de vida. Foi relatada uma frequência de colonização por *E.coli* de 86% em quantidades de 9 log₁₀ UFC.

Pode se observar que existem diferenças geográficas nas taxas de colonização por *E.coli* e que, embora não observado por todos, a melhoria das condições sócio-econômicas com o implementação de maiores cuidados de higiene, parece estar relacionada à redução nas

taxas de colonização por *E.coli* e de outra forma, piores condições sócio-econômicas estão associadas à colonização mais precoce e mais intensa por este microorganismo.

Interessante observar que oposto à elevação das taxas de colonização por *Staphylococcus* relatada na Suíça, em associação com a melhoria das condições de higiene; em nossas análises, as taxas de colonização por *Stafilococcus* foram baixas (frequência de colonização de 12% e 33% no 2º e 7º dia e nenhuma colonização identificada nas amostras de 30 dias; abundâncias relativas de apenas 2% no 2º dia e proporção máxima de 10% do 7º dia). Diante das elevadas taxas de colonização por *Stafilococcus* nas crianças suíças, é levantada a hipótese de que este super crescimento tenha ocorrido na ausência de competição pelas enterobactérias⁷⁷, na mesma linha de raciocínio pode-se supor que a maior ocorrência da *E. coli* tenha inibido maior proliferação do *Stafilococcus*) (tab. 4).

Pode se observar nesta investigação que o *Streptococcus*, por sua vez, embora não tenha alcançado abundâncias relativas elevadas (8%, 11% e 6%), foi detectado em praticamente metade das crianças em cada ponto de análise (frequências de colonização de 62%, 56% e 44%) (tab. 4) tendo uma representação mais significativa do que o *Stafilococcus*. Esta detecção frequente por *Streptococcus* não é descrita em outros estudos^{72,76,78}, por exemplo, no estudo de Adlerberth et al.⁷² que evidenciaram alta colonização por *Staphylococcus*, não há menção da ocorrência de *Streptococcus*.

Uma detecção em mais da metade dos indivíduos ocorreu ainda no segundo dia de vida, o que sugere possível transferência através da microbiota vaginal materna. É possível que padrões específicos de microbiota vaginal justifiquem esta colonização inicial⁷⁹. As taxas de ocorrência aos 30 dias sugerem contaminação posterior pelo meio ambiente. No trabalho clássico de Mata et al⁶⁰, em crianças morando em comunidades pobres na Guatemala, ainda na década de 70, os autores descrevem a ocorrência de *Streptococcus* como um dos principais colonizadores bacterianos deste grupo de indivíduos. O fenômeno (maior colonização por

Streptococcus) ocorreu em uma comunidade desfavorecida. A maior prevalência do *Streptococcus* β hemolítico do grupo A é descrita em associação com regiões menos favorecidas⁸⁰.

Levando-se em conta que o *Streptococcus* ainda é altamente prevalente na população do presente estudo, a maior ocorrência de *Streptococcus* deve ser justificada em vista da maior transmissibilidade do mesmo no ambiente brasileiro.

Entre os componentes anaeróbios ocorreu um predomínio do gênero *Clostridium* nas amostras de 30 dias (encontrado em abundância relativa de 33% comparada a 12% de *Bacteroides* e 8% de *Veillonella*). Mesmo em sendo analisado este fato, considerando a possibilidade do nível populacional de *Clostridium* estar abaixo das bifidobactérias, o dado chama atenção, inclusive porque a frequência de colonização também foi significativa (50% dos recém-nascidos apresentavam seqüências relativas ao *Clostridium*). Tal achado não é comumente descrito nas crianças em aleitamento materno exclusivo nas quais os estudos descrevem baixas taxas de colonização^{57,63,75,78,81}. No estudo de Penders et al.⁸¹ no qual foram analisadas 1.032 amostras de bebês com um mês de vida na Holanda, a frequência de colonização por *Clostridium* foi de 21% e a contagem média encontrada foi baixa (4,5 log₁₀). Este fato, entretanto, não parece ser uma obrigatoriedade.

Existem várias espécies de *Clostridium* e não se sabe quais espécies predominaram nessas amostras, entretanto, em vista que, muito do que é descrito na literatura se refere ao *Clostridium difficile*, esses dados serão utilizados como um parâmetro da epidemiologia. O *Clostridium* pode ser transferido ao nascimento da microbiota vaginal materna, mas a contaminação proveniente do ambiente hospitalar parece ter um impacto ainda maior sobre a contaminação do recém-nascido⁸². Brazier⁸³, em revisão sobre a epidemiologia do *Clostridium difficile*, descrevem sua capacidade de colonizar superfícies comuns do meio ambiente como o solo, a água, animais e utensílios domésticos. Em estudo realizado no Japão,

foi demonstrada a possibilidade de contaminação ambiental maciça pelo *Clostridium* em ambientes não hospitalares⁸⁴. Os autores pesquisaram a ocorrência de *Clostridium* em lactentes e crianças pequenas frequentadoras de creches e também colheram amostras das superfícies destes estabelecimentos. Uma alta taxa de colonização foi detectada, principalmente nas crianças abaixo de dois anos (84%). As análises ambientais revelaram grande quantidade de *Clostridium* no ambiente, tendo sido identificada associação entre as cepas encontradas no ambiente com aquelas isoladas nos indivíduos⁸⁴.

Diferenças macro e micro regionais devem determinar a maior ou menor taxa de colonização ambiental por *Clostridium*. Possíveis fontes colonizadoras iniciais seriam as mães, ou o ambiente hospitalar e posteriormente o ambiente doméstico. É possível que, sujeitos a uma taxa de contaminação externa elevada, maior número de recém-nascidos em aleitamento tenham sido colonizados por *Clostridium*, podendo-se supor que esta taxa poderia ser ainda maior caso não estivessem alimentados ao seio.

Bacteroides foram identificados em cerca de 30% dos indivíduos ao longo do primeiro mês de vida sem alcançar proporções elevadas. A taxa descrita de colonização por *Bacteroides* varia bastante entre os estudos (em crianças holandesas com um mês foi de 80%, já em crianças suíças foi de 30%)^{72,76}. Na composição anaeróbia dos recém-nascidos em aleitamento materno é descrito que as bifidobactérias predominam, seguidas dos *Bacteroides*^{62,63,75,77}, não sendo, entretanto, encontrado em níveis populacionais elevados. A taxa de colonização e o nível populacional tende a aumentar ao longo da infância (principalmente com a introdução de alimentos sólidos, associado à redução dos níveis de bifidobactérias)⁷¹ tornando-se um dos principais anaeróbios encontrado nos adultos⁸⁵.

Palmer et al.⁴⁸ acompanharam um grupo de crianças, através da epidemiologia molecular da microbiota das fezes, usando *microarray* e biblioteca 16S rDNA e destacaram ter observado, nos primeiros meses de vida, taxas de colonização por *Bacteroides*, bastante

variáveis entre os indivíduos, enquanto nas análises de fecais de crianças com um ano de idade todos estavam colonizados.

Os *Lactobacillus* foram detectados entre 20% e 30% dos recém-nascidos apenas nas amostras de 7 dias e 30 dias de vida, com baixa abundância relativa. De fato, na literatura observam-se baixas taxas de *Lactobacillus* nos primeiros meses^{62,75,76,86}. As primeiras espécies de *Lactobacillus* que colonizam o bebê são transferidas da microbiota vaginal da mãe durante o parto, fato verificado no estudo de Matsumiya et al.⁸⁷. Essa quantidade de *Lactobacillus* na microbiota vaginal sofre variações entre diferentes grupos de mulheres, tendo possível relação com condições sócio-econômicas⁷⁹. Baixos níveis populacionais de *Lactobacillus* na microbiota vaginal dessas mães poderiam estar relacionados com a não identificação de *Lactobacillus* nas análises do 2º dia. No estudo de Ahrné et al.⁸⁶ que avaliaram a evolução da colonização por *Lactobacillus* em 112 crianças suíças, os autores descrevem taxas de colonização na primeira semana de 21% e com 1 mês de 25%, a contagem de *Lactobacillus* também se manteve baixa, um pico de colonização só ocorreu aos 6 meses.

As bifidobactérias foram analisadas nas amostras de 30 dias através de um método molecular quantitativo (real-time PCR) que permitiu não apenas identificar sua ocorrência nas amostras fecais como também fazer uma estimativa de nível populacional na amostra. Foi identificada a ocorrência de bifidobactérias em todos os recém-nascidos do grupo, em quantidade média da ordem de $10,9 \log_{10}$ UFC (7,6 – 12,6). Este achado está de acordo com o que tem sido descrito em outros países do mundo, em recém-nascidos submetidos a aleitamento materno.

Penders et al.⁵⁷, analisando 50 recém-nascidos na Holanda descrevem taxas de colonização de 100% e níveis populacionais entre 5,5 – 11,3 $\log_{10}$ UFC; Chen et al.⁸⁸, analisando 40 recém-nascidos na China descrevem taxas de colonização de 100% e níveis populacionais de 7,8 – 10,9 $\log_{10}$ UFC; Yoshika et al.⁶² analisando seis recém nascidos no

Japão observaram taxas de colonização de 100% e níveis populacionais médios de $11,3 \log_{10}$ UFC; entre outros. Existem, entretanto, alguns estudos que relatam menores taxas de colonização por bifidobactérias, como o de Simhon et al.⁶¹. que analisando 16 crianças em aleitamento materno, encontraram apenas uma colonizada com $4,3 \log_{10}$ UFC de bifidobactéria e o de Lundquist et al.⁶⁴ que analisaram 15 bebês na Suíça e encontraram uma taxa de colonização, no primeiro mês, de 105 e níveis populacionais de $7 \log_{10}$ UFC. É provável que essas diferenças sejam reflexo de questões metodológicas e não de diferenças regionais²⁸.

Bifidobactérias já seriam encontradas no microbiota intestinal a partir do segundo dia de vida, a partir daí elas cresceriam rapidamente se tornando, na primeira semana de vida, o microorganismo predominante da microbiota de recém-nascidos em aleitamento materno^{62,78}. Não se sabe ao certo a origem dessas bifidobactérias, sendo descrita a possibilidade de transferência a partir da microbiota materna⁸⁹ e talvez, através do próprio leite materno⁵. No estudo de Gronlund et al.⁵. pesquisaram a presença de bifidobactérias no leite de 60 mães e nas fezes de seus recém nascidos. Embora os autores tenham detectado a presença de bifidobactérias em todas as amostras, não houve associação entre as espécies encontradas no leite com aquelas isoladas das amostras fecais dos recém-nascidos. Ainda assim, os autores sugerem que o leite materno é um suprimento constante de bifidobactérias para o trato gastrointestinal dos recém-nascidos.

4.7 Uso de antibiótico em uma criança e as repercussões sobre a composição da microbiota

É sabido que o uso de antimicrobianos tem um impacto sobre os constituintes bacterianos que compõem a microbiota. No trabalho de Sakata et al.⁴⁰. analisaram o comportamento da microbiota fecal de 54 crianças submetidas a diferentes antibióticos administrados por via oral (ampicilina, penicilina, eritromicina, cefaclor e gentamicina) e

também por via venosa (ampicilina, metilicina e ceftazidime). Eles observaram que todos os antibióticos alteraram quantitativamente e qualitativamente a microbiota. O padrão característico observado foi de considerável supressão de bifidobacterias, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Foi observada ainda redução significativa da *E. coli* e proliferação de *Klebsiella*. Bennet et al.⁴¹ compararam a composição da microbiota fecal de recém-nascidos submetidos a regimes antibióticos diferentes com recém-nascidos não submetidos a tratamento. Constataram também que todos os antibióticos levaram a supressão das bactérias anaeróbias. Além disso, foi observado o super crescimento da *Klebsiella* e o aumento da colonização por *Clostridium*. Após duas semanas 57% das crianças voltaram a ser colonizadas por bactérias anaeróbias.

Nesta pesquisa, uma criança teve indicação de fazer uso de antibiótico oral (cefalexina) no 7º dia de vida. Em vista desta intervenção, esta criança foi retirada da análise grupal, uma vez que o antibiótico poderia alterar a sucessão microbiana normal analisada nas outras crianças. Pode ser feita uma tentativa de analisar o impacto do uso deste antimicrobiano comparando-se o perfil da microbiota desta criança no 30º dia de vida (coleta fecal realizada 13 dias após a suspensão do antibiótico) com o restante do grupo normal.

A natureza dos dados e o tamanho da amostra não permitem que análises estatísticas sejam realizadas. Todavia, observa-se que a abundância relativa da *Klebsiella* encontra-se, em níveis relativos, 14 vezes maiores do que o observado para o grupo no mesmo ponto de tempo. Observa-se, ainda, a redução da abundância relativa da *E. coli* para 6% do valor observado no 2º dia de vida; 7,5 vezes menor do que a abundância observada na análise grupal. A proporção de anaeróbios também diverge da manifestação observada no grupo onde estes componentes se encontram predominantes na biblioteca do 30º dia (58% de abundância relativa); nesta criança os anaeróbios representaram apenas 35% das seqüências. *Clostridium* passou a ser detectado na amostra, embora em quantidades relativas menores que a observada

para o grupo. O nível populacional das bifidobactérias na amostra do 30º dia de vida desta criança encontrava-se um pouco inferior à média do grupo ($9,8 \log_{10}$ UFC contra $10,9 \log_{10}$ UFC), porém dentro do intervalo de valores encontrados nas crianças ($7,60$ a $12,26 \log_{10}$ UFC), possivelmente representando sua recuperação populacional. Esse conjunto de eventos pode ter acontecido por aleatoriedade, entretanto, este fenômeno é descrito quando recém-nascidos fazem uso de ATB^{40,41}. A similaridade deste fenômeno com o que é descrito na mudança da microbiota por efeito de antibióticos, faz supor que isso não tenha ocorrido apenas por o acaso.

Afora os eventos descritos observa-se que, exclusivamente nesta criança, foi observado número significativo (23%) de seqüências atribuídas a microorganismos não cultivados, cuja identificação filogenética ainda não foi estabelecida. O mesmo já havia sido identificado na análise do 2º dia de vida, tendo seu nível populacional crescido após o uso de antibiótico.

4.8 Possível impacto da composição da microbiota na imunomodulação do hospedeiro

Desde a elaboração da teoria da higiene, vem se tentando descobrir qual, ou quais os eventos microbianos favorecem a saúde do indivíduo. A capacidade da microbiota modificar o futuro imune do indivíduo é sugerido por estudos com bactérias probióticas, que parecem prevenir o desenvolvimento de doenças alérgicas^{18,19}.

In vitro, vários estudos demonstraram a capacidade diferenciada de grupos, ou elementos bacterianos, ativar células do sistema imune. Foi demonstrado que bactérias gram-negativas e gram-positivas induzem diferentes padrões de resposta das células dendríticas e células apresentadoras de antígenos⁹⁰⁻⁹². Porém, mesmo *in vitro*, os mecanismos de resposta do sistema imune às bactérias e seus componentes não foi decifrado, tendo sido observado

diferentes respostas dependendo do tipo específico de célula apresentadora de antígeno⁹⁰ e do tipo específico de espécie bacteriana⁹².

Se tal processo parece complexo, em uma situação onde poucas variáveis são analisadas; *in vivo* a análise é ainda mais complexa. Embora em muitos estudos tenha sido tentado descobrir o evento microbiano intestinal associado com a regulação adequada do sistema imune, os resultados atuais são contraditórios, ou inconclusivos.

Enquanto de um lado evidências epidemiológicas⁷² e estudos de intervenção⁹³ sugerem um efeito modulador benéfico da *E. coli*. Outros estudos comparativos⁷⁶ e de coorte⁹⁴ sugerem que a colonização por *E. coli* está associada ao desenvolvimento de alergia.

Outros pesquisadores associaram outros eventos bacterianos ao desenvolvimento de alergia: menor colonização por *Enterococcus* e bifidobactérias⁹⁵; maior colonização por *Staphylococcus* e *Clostridium*⁹⁵ e baixos níveis de colonização por *Bacteroides*⁹⁶.

Na contra mão desses achados, pesquisas realizadas não conseguiram associar nenhum evento bacteriano ao desenvolvimento de alergia^{97,98}.

Possivelmente a análise mais prudente é que ainda há muito a ser descoberto sobre os eventos microbianos intestinais, e seu efeito imune regulador. O desafio é descobrir o tempo e as características dos eventos bacterianos capazes de modificar o futuro imune do indivíduo, e possivelmente interferir em eventos iniciais de forma a garantir o estabelecimento de uma microbiota mais benéfica para o hospedeiro.

5. Conclusões

A microbiota fecal do grupo de recém-nascidos estudados aumentou em diversidade das amostras iniciais para o 30º dia de vida. Na análise grupal das microbiotas fecais de nove recém-nascidos observou-se predomínio inicial de microorganismos aeróbios que declinaram em abundância relativa do 2º para o 30º dia de vida. Observou-se, concomitantemente, aumento dos microorganismos anaeróbios que passaram a predominar na análise do 30º dia. Os grupos bacterianos predominantes foram *E. Coli* na análise do 2º dia de vida e *Clostridium* na análise do 30º dia. A maior abundância destes microorganismos na microbiota fecal deste grupo de recém-nascidos pode ter ocorrido devido a maior contaminação ambiental. Bifidobactérias foram identificadas em quantidades normais nesse grupo de indivíduos. A metodologia molecular de construção de biblioteca 16S rDNA não foi adequada para a análise das bifidobactérias. O uso de antibiótico parece ter alterado de forma característica o perfil da microbiota de uma criança.

Embora tenha sido feita uma tentativa de explicar os fenômenos bacterianos encontrados nesses recém-nascidos à luz dos conhecimentos existentes na literatura, ficam muitas suposições. O fato de se estar diante de uma pesquisa pioneira em crianças brasileiras, não permite comparar os resultados do estudo atual com parâmetros apropriados. Não se conhece o impacto dos fatores ambientais próprios desta região sobre o processo de colonização intestinal pelos diversos grupos bacterianos. Outros estudos são necessários buscando melhor entendimento de como se processa a colonização bacteriana intestinal nas crianças brasileiras.

Referências

1. Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* 2006;21(9):517-23.
2. Gaskins HR, Croix JA, Nakamura N, Nava GM. Impact of intestinal microbiota on the development of mucosal defense. *Clin Infect Dis* 2008;46(Suppl. 2):S80-6.
3. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine”, held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr* 2003;78(4): 675-83.
4. Mitchell DK, Van R, Mason EH, Norris DM, Pickering LK. Prospective study of toxigenic *Clostridium difficile* in children given amoxicillin/clavulanate for otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15(6):514-9.
5. Gronlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Gronroos T, Salminen S, Isolauri E. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium microbiota* in infants at risk. *Clin Exp Allergy* 2007;37(12):1764-72.
6. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4(6):478-85.
7. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997;159(4):1739-45.
8. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(Suppl. 1):S1035-45S.
9. Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999;76(1-4):265-78.
10. van der Waaij LA, Harmsen HJ, Madjipour M, Kroese FG, Zwiers M, van Dullemen HM, de Boer NK, Welling GW, Jansen PL. Bacterial populations analysis of human

colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(10):865-71.

11. Delgado S, Suárez A, Mayo B. Bifidobacterial diversity determined by culturing and by 16S rDNA sequence analysis in feces and mucosa from ten healthy Spanish adults. *Dig Dis Sci* 2006;51(10):1878-85.
12. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(7):3401-7.
13. Savage DC. Introduction of mechanisms of association of indigenous microbes. *Am J Clin Nutr* 1979;32(1):113-8.
14. Liévin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000;47(5):646-52.
15. Rautava S, Isolauri E. The development of gut immune responses and gut microbiota: effects of probiotics in prevention and treatment of allergic diseases. *Curr Issues Intest Microbiol* 2002;3(1):15-22.
16. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microb Mol Biol Rev* 1998; 62:1157-70
17. Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, Dupont C, Frick JS, Frokiaer H, Heinrich J, Garn H, Koletzko S, Lack G, Mattelio G, Renz H, Sangild PT, Schrezenmeir J, Stulnig TM, Thymann T, Wold AE, Koletzko B. Early nutrition and immunity – progress and perspectives. *Br J Nutr* 2006;96(4):774-90.

18. Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(1):129-34.
19. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilomi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4 year follow up of a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361(9372):1869-71.
20. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989; 299(6710):1259-60.
21. Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease – an extended version. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 2004;38(4):378-88.
22. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(6):1260-7.
23. Young SL, Simon MA, Baird MA, Tannock GW, Bibiloni R, Spencely K, Lane JM, Fitzharris P, Crane J, Town I, Addo-Yobo E, Murray CS, Woodcock A. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diag Lab Immunol* 2004;1(4):686-90.
24. Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 2003;52(10):1522-9.
25. Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS* 1995;103(1):1-19.
26. Suzuki K, Ha SA, Tsuji M, Fagarasan S. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Sem Immunol* 2007;19(2):127-35.

27. Midvedt AC, Carlstedt-Duke B, Norin KE, Saxerholt H, Midvedt T. Development of five metabolic activities associated with the intestinal microflora of healthy infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1988;7(4):559-67.
28. Edwards CA, Parret AM. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr* 2002;88(Suppl 1):S11-8.
29. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361(9356): 512-9.
30. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101(44):1578-23.
31. Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(10):3854-9.
32. Toivanen P, Vaahtovuori J, Eerola E. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. *Infect Immun* 2001;69(1):2372-77.
33. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans van Vliet WM, de Visser JAGM, de Vos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbiol Ecol Health Dis* 2001;13(1):129-34.
34. Stewart JA, Chadwick VS, Murray A. Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *J Med Microbiol* 2005;54(12):1239-42.
35. Smith S, Vaughan EE, De Vos WM. Quorum sensing within the gut. *Microbiol Ecol Health Dis* 2000; 2(Suppl): 81-92.

36. Grolund M, Lehtonen O, Erola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: Permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28(1):19-25.
37. Coppa GV, Bruni S, Morelli L, Soldi S, Gabrielli O. The first prebiotics in humans. *J Clin Gastroenterol* 2004;38(Supp. 2):S80-3.
38. Adlerberth I, Carlsson B, de Man P, Jalil F, Khan SR, Larsson P, Mellander L, Svanborg C, Wold AE, Hanson LA. Intestinal colonization with enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediatr Scand* 1991;80(6-7):602-10.
39. Adlerberth I, Jalil F, Carlsson B, Mellander L, Hanson LA, Larsson P, Khalil K, Wold AE. High turnover rate of *Escherichia coli* strains in the intestinal flora of infants in Pakistan. *Epidemiol Infect* 1998;121(3):587-98.
40. Sakata H, Fujita K, Yoshioka H. The effect of antimicrobial agents on the fecal flora of children. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29(2):225-9.
41. Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterstrom R. Suppression of aerobic and anaerobic faecal flora in newborns receiving parental gentamicina and ampicilina. *Acta Paediatr Scand* 1982;71(4):559-62.
42. Tannock GW. New perceptions of the gut microbiota: implications on future research. *Gastroenterol Clin N Am* 2005;34(3):361-82.
43. Zoedental E, Cheng B, Koike S, Mackie RI. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr Issues Intestinal Microbiol* 2004;5(2):31-47.
44. Blaut M, Collins MD, Welling GW, Doré J, van Loo J, de Vos W. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human flora project. *Br J Nutr* 2002;87(Suppl 2):S203-11.

45. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular specie within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(11): 4799-807.
46. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogeetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture methods. *Microbiol Immunol* 2002;46(8):535-48.
47. Passaglia LMP, Zaha A. Técnicas de biologia molecular. In: Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP, editors. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto; 2003. p. 378-413
48. Palmer C, Bik EM, Digiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007;5(7): e177.
49. Wang M, Ahrné S, Antonsson M, Molin G. T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages. *J Microbiol Method* 2004;59(1):53-69.
50. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*. 2001;68(1):219-26.
51. Favier CF, de Vos WM, Akkermans ADL. Development of bacterial communities in feces of newborn babies. *Clin Microbiol* 2003;9(5):219-29.
52. Park HK, Shim SS, Kim SY, Park JH, Park SE, Kim HJ, Kang BC, Kim CM. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J Microbiol*. 2005;43(4): 345-53.
53. Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM, Tiedje JM. The ribosomal database project (RDP-II):

- previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 2003;31(1):442-3.
54. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 1994; 22(22):4673-80.
55. Schloss PT, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(3):1501-6.
56. Schloss PT, Larget BR, Handelsman J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(9):5485-92.
57. Penders J, Cornelis V, Driessen C, London N, Thijs C, Stobberingh EE. Quantification of *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243(1): 141-7.
58. Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 1997;21(3):213-29.
59. Sipos R, Székely AJ, Palatinszky M, Révész S, Márialigeti K, Nikolausz M. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 60(2):341-5.
60. Mata LJ, Mejicanos ML, Jimenez F. Studies on the indigenous gastrointestinal flora of Guatemalan children. *Am J Clin Nutr* 1972;25(12):1380-90.
61. Simhon A, Douglas JR, Drasar BS, Soothill JF. Effect of feeding on infants' faecal flora. *Arch Dis Child* 1982;57(1):54-8.

62. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle fed infants. *Pediatrics* 1983;72(3): 317- 21.
63. Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 1984;28(9): 975-86
64. Lundequist B, Nord CE, Winbeg J. The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatr Scand* 1985;74(1):45-51.
65. Rubaltelli FF, Biadaoli R, Pecile P, Nicoletti P. Intestinal flora in breast fed and bottle-fed infants. *J Perinat Med* 1998;26(3):186-91.
66. Schwiertz A, Gruhl B, Lobnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of intestinal bacteria composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res* 2003;54(3):393-9.
67. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(1):219-26.
68. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahra T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, Takami H, Morita H, Sharma VK, Srivastava TP, Taylor TD, Noguchi H, Mori H, Ogura Y, Ehrlich DS, Itoh K, Takagi T, Sakaki Y, Hayashi T, Hattori M. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007;14(4):169-81.
69. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003;91(441):48-55.
70. Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MMS. Microbiota ou flora normal do corpo humano. In: Trabulsi LR, Althertum F, editores. *Microbiologia*. 4^a ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 101-109.
71. Orrhage K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr Suppl* 1999;88(430):47-57.

72. Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Wold AE. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res* 2006; 59(1):96-101.
73. Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N, Wold AE, Adlerberth I. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res*. 2003;54(1):8-14.
74. Mah KW, Sangsupawanich P, Tunyapanit W, van Bever H, Shek LP, Chua KY, Lee BW. Gut microbiota of children living in rural south Thailand and urban Singapore. *Allergol Int* 2008;57(1):65-71.
75. Mah KW, Chin VIL, Wong WS, Lay C, Tannock GW, Shek LP, Aw MM, Chua KY, Wong HB, Panchalingham A, Lee BW. Effect of a milk formula containing probiotics on the fecal microbiota of asian infants at risk of atopic disease. *Pediatr Res* 2007;62(6): 674-9.
76. Penders J, Stobberingh EE, Thijs C, Adams H, Vink C, van Ree, van den Brandt PA. Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing. *Clin Exp Allergy* 2006;36(12):1602-08.
77. Lindberg E, Adlerberth I, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N, Wold AE. High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. *J Clin Microbiol* 2004;42(2): 530-4.
78. Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30(1):61-7.

79. Goldenberg RL, Klebanoff MA, Nugent R, Krohn MA, Hillier S, Andrews WW. Bacterial colonization of the vagina during pregnancy in four ethnic groups. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174(5):1618-21.
80. Ahn SY, Ingulii E. Acute poststreptococcal glomerulonephritis: an update. *Curr Opin Padiatr* 2008; 20(2):157-62.
81. Penders J, Thijs C, Vink C, Stema FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006;118(2): 511-21.
82. MacFarland LV, Brandmarker SA, Guandalini S. Pediatric *Clostridium difficile*: a pahntam or a clinical reality? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31(3): 220-31.
83. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *J Antim Chem* 1998;41(Suppl C):47-57.
84. Matsuki S, Ozaki E, Shozu M, Inoue M, Shimizu S, Yamaguchi N, Karasawa T, Yamagishi T, Nakamura S. Colonization by *Clostridium difficile* of neonates in a hospital, and infants and children in three day-care facilities of Kanazawa, Japan. *Int Microbiol* 2005;8(1):43-8.
85. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Variations in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis* 2002;34(Suppl 12):S12-8.
86. Ahrné S, Lonnermark E, Wold AE, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Molin G, Adlerberth I. *Lactobacilli* in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microb Infect* 2005;7(11-12):1256-62.
87. Matsumiya Y, Kato N, Watanabe K, Kato H. Molecular epidemiological study of the vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Chemother* 2002;8(1):43-9.

88. Chen J, Cai W, Feng Y. Development of intestinal bifidobacteria and lactobacilli in breast-fed neonates. *Clin Nutr* 2007;26(5):559-66.
89. Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA. Plasmid profiling of members of the family *Enterobacteriaceae*, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J Clin Microbiol* 1990;28(6):1225-8.
90. Karlsson H, Larsson P, Wold AE, Rudin A. Pattern of cytokine responses to gram-positive and gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. *Infect Immun* 2004;72(5):2671-78.
91. Hessle C, Anderson B, Wold A. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while Gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun* 2000;68(6):3581-6.
92. Smits HH, van Beelen AJ, Hessle C, Westland R, de Jong E, Soeteman E, Wold A, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced TH1 development. *Eur J Immunol* 2004;34(5):1371-80.
93. Kocourkova I, Zadnikova R, Ziza J, Rosova V. Effect of oral application of a probiotic *E. coli* strain on the intestinal microflora of children of allergic mothers during the first year of life. *Folia Microbiol* 2007;52(2):189-93.
94. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijdrers B, Stelma F, Adams H, van Ree R, Stobberingh EE. Gut microbiota composition and development of atopic manifestation in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 2007;56(5):661-7.
95. Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(4):516-20.

96. Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen O, Isolauri E. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;83(3):186-92.
97. Murray CS, Tannock GW, Simon MA, Harmsen HJ, Welling GW, Custovic A, Woodcock A. Fecal microbiota in sensitized wheezy and non-sensitized children: a nested case-control study. *Clin Exp Allergy* 2005;35(6):741-45.
98. Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, Ahrne S, Orfei L, Aberg N, Perkin MR, Tripodi S, Hesselmar B, Saalman R, Coates AR, Bonanno CL, Panetta V, Wold A. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(2):343-50.

Apêndice

Apêndice 1

Pesquisa - Flora normal da criança: desenvolvimento e características.

Pesquisadora executante – Dra. Kátia Galeão Brandt.

Nome do paciente: _____
Sexo: _____ Data de nascimento: _____
Responsável: _____
Endereço: _____ Fone: _____

Formulário de consentimento livre e esclarecido.

Caros pais ou responsáveis;

Estamos realizando um estudo sobre a flora intestinal das crianças. Flora intestinal corresponde ao conjunto de bactérias que residem em nosso intestino. Essa flora intestinal é muito importante para a saúde das pessoas. Entre outras funções ela ajuda a estimular as defesas do nosso organismo, ajuda o nosso organismo a se defender de outras bactérias chamadas patogênicas, ou seja, que têm a capacidade de causar doença e ajudam o intestino a aproveitar melhor o alimento.

Através deste estudo esperamos conhecer, por meio de exames de cultura de fezes, as bactérias que fazem parte da flora intestinal de um grupo de crianças nascidas neste hospital assim como desejamos investigar os fatores que podem interferir na composição desta flora.

Esse conhecimento tem importância uma vez que ainda não se conhece adequadamente como ocorre a formação da flora intestinal das crianças brasileiras. Acredita-se que, sabendo-se mais sobre a forma de instalação da flora e como ela se mantém, seria possível tomar medidas que ajudassem o indivíduo a constituir uma flora mais saudável, trazendo benefícios para a saúde da pessoa até a vida adulta.

Gostaríamos do seu(s) consentimento(s) para coletar amostras de fezes de sua criança periodicamente até ela completar dois anos de idade. As coletas estão programadas para serem realizadas ao nascimento, com 15 dias e com 30 dias. A partir do segundo mês coletaríamos fezes mensalmente e no segundo ano de vida, a coleta de fezes seria feita a cada três meses.

Pretendemos realizar a coleta de fezes através de um “swab anal”, que é uma haste fina de madeira com algodão na ponta (assemelha-se ao conhecido “cotonete”), que deverá ter uma pequena porção introduzida suavemente no ânus da criança para retirada de uma amostra de fezes. Tal procedimento não deverá provocar dor na sua criança e pode ser comparado à colocação de um supositório.

Nos dias das coletas sua criança realizaria acompanhamento médico pediátrico sendo realizadas as orientações necessárias para o crescimento saudável da criança nas diversas idades.

Precisaríamos colher informações sobre a família e sobre o meio no qual a criança vai morar. Necessitaríamos colher continuamente informações sobre os diversos alimentos que a criança receber, assim como informações sobre fatos importantes ocorridos com a criança como doenças e uso de medicações.

Este acompanhamento não acarretará nenhum custo para os responsáveis, sendo toda despesa de transporte ou outro gasto relativo à pesquisa custeado pela verba destinada à pesquisa.

A pesquisadora responsável pela pesquisa se responsabiliza pelo bem estar das crianças envolvidas na pesquisa, garantindo que não serão tomadas medidas que possam de alguma forma prejudicar as crianças.

Uma vez levantadas às informações elas serão utilizadas para publicação em revistas médicas e eventualmente apresentada em eventos médicos, tornando-se úteis para o saber de outros médicos e pesquisadores.

Apesar do exposto, os responsáveis não devem se sentir obrigados a consentir com a realização da pesquisa. A criança cujos responsáveis não consentirem com a pesquisa receberá toda assistência médica e acompanhamento necessário, conforme é padronizado pelo hospital, sem nenhum prejuízo. Ressaltamos ainda a criança poderá sair da pesquisa no momento que os responsáveis julgarem necessário, sem que isso novamente, traga prejuízo para ela.

Declaro que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que foi explicado, consinto na participação do meu filho no presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de 200__.

Dra. Kátia Galeão Brandt
Rua Camilo 556
Edf Dolce Vita/ Bloco Dolce Amore
Vila Romana CEP: 05045 020
Fone: (11) 3675 9510
(11) 9258 7090

Hospital Universitário
Av Prof. Lineu Prestes, 2565
Cidade Universitária, São Paulo
CEP: 05508 900
Fone: (11)3039 9457
(11) 3039 9479

Anexos

Anexo 1

Fls. nº 78
Rubrica

São Paulo, 20 de agosto de 2005.

Il^{mo}(a). S^{ra}(a).

Profa. Dra. Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas – Edifício ICB IV
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Flora intestinal normal da criança: desenvolvimento e características” - **Registro CEP: 574/05**

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária de 19 de agosto de 2005, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório está previsto para **19 de agosto de 2006**.

Atenciosamente,

Dra. Maria Teresa Zulini da Costa
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HU/USP

Anexo 2

Ao
Departamento de Pediatria

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 19.06.07, tomou ciência da execução do Protocolo de Pesquisa nº **0435/07**, intitulado: **"FLORA INTESTINAL NORMAL DA CRIANÇA: DESENVOLVIMENTO E CARACTERÍSTICAS"**.

No que tange sua parte empírica está sendo desenvolvido no **HOSPITAL UNIVERSITÁRIO-HU-USP**, tendo seu Comitê de Ética aprovado o estudo em 19.08.05.

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Magda Carneiro-Sampaio**

Pesquisador (a) Executante: **Kátia Galeão Brandt**

CAPPesq, 19 de junho de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa