

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área Análises Clínicas

Análise da diversidade da microbiota fecal de lactentes durante o primeiro ano de vida utilizando biblioteca *16S RNA*

**Fernanda Filomena de Oliveira**

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:

Prof<sup>a</sup>. Tit. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo

2011

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área Análises Clínicas

**Análise da diversidade da microbiota fecal de lactentes durante o primeiro ano  
de vida utilizando biblioteca 16S RNA**

**Fernanda Filomena de Oliveira**

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:

Prof<sup>a</sup>. Tit. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo

2011

**Fernanda Filomena de Oliveira**

**Análise da diversidade da microbiota fecal de lactentes durante o primeiro ano  
de vida utilizando biblioteca *16S RNA***

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof<sup>a</sup>. Tit. Marina Baquerizo Martinez

Orientador/Presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

*Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, Francisco e Geralda, por terem me ensinado os bons valores da vida e por acreditarem nos meus sonhos, os quais sem eles, jamais se tornariam reais.*

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, que, em sua infinita bondade, me capacitou para vencer mais uma etapa da realização deste sonho.

**À Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez** por ter me acolhido com confiança em seu laboratório, auxiliando no meu crescimento como profissional e como pessoa. Minha sincera gratidão e reconhecimento pela orientação, dedicação e competência profissional.

**À Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves** pela oportunidade, por seu apoio e dedicação incondicionais desde muito antes do início deste trabalho. Agradeço por ter participado ativamente de todas as etapas deste estudo. Seu exemplo não foi só profissional, e sinto-me realmente privilegiada em todos os aspectos por tê-la como mentora e modelo a ser seguido. Obrigada por sua amizade; espero que os nossos laços se estendam para além deste trabalho.

**Ao Dr. Rubens Duarte**, pelo auxílio na realização das análises estatísticas. Muito obrigada por todo conhecimento compartilhado, pela imensa colaboração e compreensão na fase final deste trabalho.

**Ao Francisco (Kiko)** por todo profissionalismo e tempo dispensado na construção das inúmeras planilhas utilizadas neste trabalho.

### **Aos meus queridos amigos de laboratório:**

As amigas do grupo da “Microbiota” **Silvia Toledo, Isabel e Juliana**, pelas inúmeras ajudas no laboratório, por todos os problemas compartilhados na condução dos experimentos.

**Daniela:** obrigada por me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho, por todos os experimentos que realizamos juntas, pela sua inestimável amizade, que vou levar por toda minha vida.

**Elisabeth**, pela troca de conhecimentos e experiências, por estar sempre disposta a ajudar: obrigada por todo seu apoio incentivo e amizade.

**Fabiana**, por tornar nossa vida mais fácil no laboratório, por todo auxílio, amizade e companheirismo em todos os momentos.

**Hadassa:** obrigada por sua amizade incondicional, pela sua alegria contagiante, por todo seu carinho e por me apoiar em todos os momentos da minha vida.

**Juliana Campos**, pelo otimismo e apoio constantes, por me deixar alegre nos momentos tristes, pela sua amizade, por todo auxílio prestado na finalização deste trabalho e por compartilhar ao meu lado todos os momentos mais difíceis.

**Lucas**, obrigada pelas discussões e sugestões, por toda a paciência em compartilhar comigo seus conhecimentos em imunologia.

**Milton**, pela alegria e momentos de descontração.

**Renée**, por todo seu carinho, cuidado e alegria, suas tagarelices sempre alegraram meus dias, obrigada por sua amizade.

**Silvinha, Lilian, Renatinha, Carol, Soninha, Ísis, e Mariana**: obrigada pela amizade e a agradável convivência.

**Aos meus pais Francisco e Geralda**, cujo exemplo de dedicação e compreensão foi a base da minha formação.

**Ao meu amado Marcos**, por todo amor, apoio e compreensão, por não me deixar desistir nos momentos difíceis e por estar sempre ao meu lado. Agradeço por me amar incondicionalmente, por ser meu grande amigo de todas as horas, por secar minhas lágrimas com uma graça singela e trazer amor ao meu coração com um simples olhar.

**Ao meu irmão Marcos e minha sobrinha Stefany**, por todo apoio e incentivo.

**As minhas amadas avós Efigênia e Zumerinda**, por todas as orações dedicadas a mim.

A todos que me ajudaram, incentivaram e apoiaram. **Muito Obrigada!**

## Poema da paz

O dia mais belo? Hoje.  
A coisa mais fácil? Equivocar-se.  
O obstáculo maior? O medo.  
O erro maior? Abandonar-se.  
A raiz de todos os males? O egoísmo.  
A distração mais bela? O trabalho.  
A pior derrota? O desalento.  
Os melhores professores? As crianças.  
A primeira necessidade? Comunicar-se.  
O que mais faz feliz? Ser útil aos demais.  
O mistério maior? A morte.  
O pior defeito? O mau humor.  
A coisa mais perigosa? A mentira.  
O sentimento pior? O rancor.  
O presente mais belo? O perdão.  
O mais imprescindível? O lar.  
A estrada mais rápida? O caminho correto.  
A sensação mais grata? A paz interior.  
O resguardo mais eficaz? O sorriso.  
O melhor remédio? O otimismo.  
A maior satisfação? O dever cumprido.  
A força mais potente do mundo? A fé.  
As pessoas mais necessárias? Os pais.  
A coisa mais bela de todas? O AMOR.

**Madre Tereza de Calcutá**

Oliveira, FF. Análise da diversidade da microbiota fecal de lactentes durante o primeiro ano de vida utilizando biblioteca *16S RNA*. (dissertação) São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2011.

## RESUMO

A microbiota intestinal humana desempenha papel essencial no organismo saudável, pois sintetiza vitaminas, influencia no desenvolvimento e maturação do sistema imune da mucosa intestinal, além de exercer importante função protetora, competindo por nutrientes e receptores com bactérias patogênicas. A colonização desta microbiota se inicia na criança recém-nascida e alcança estabilidade em torno do segundo ano de vida, com consequência para a saúde da criança e do adulto. As diferenças na composição da microbiota estão relacionadas a diferentes níveis de contaminação ambiental e de diferentes fatores endógenos. O objetivo do nosso estudo foi analisar a microbiota fecal de crianças com idade entre 2 dias a 1 ano de idade, que vivem em baixas condições socioeconômicas em São Paulo, Brasil. Foram coletadas amostras de fezes de crianças saudáveis, nos seguintes pontos pós-nascimento: 2º e 7º dias, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 1 ano de vida. O DNA bacteriano foi extraído diretamente a partir das amostras de fezes e as bibliotecas *16S rRNA* foram construídas utilizando 2 iniciadores bactéria-específicos. Os clones foram selecionados aleatoriamente, parcialmente sequenciados e analisados com base em bibliotecas de gene *16S rRNA*. Os principais grupos filogenéticos identificados foram *Escherichia*, *Clostridium*, *Streptococcus* e *Bacteroides*, do 1º ao 30º dia de vida. A partir do 3º mês, *Streptococcus* e bactérias não cultiváveis, além do gênero *Escherichia*, ganharam relevância na microbiota. Estes dados, em conjunto com as informações nutricionais, intercorrências clínicas e ambientais, sugerem a influência da contaminação ambiental e interpessoal no aumento da complexidade na composição da microbiota fecal. Essa abordagem molecular permitiu a análise da microbiota fecal do grupo selecionado, encontrando perfil bacteriano diferente do que é descrito nos países desenvolvidos.

**Palavras-chave:** Microbiota fecal. Biblioteca *16S RNA*. Análise Filogenética.



Oliveira, FF. Analysis of the diversity of fecal microbiota of infants during the first year living library using *16S RNA*. (dissertation) São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2011.

## ABSTRACT

The human intestinal microbiota plays essential role in healthy body since it synthesizes vitamins, influences on the development and maturation of the immune system of the intestinal mucosa. Furthermore, it also plays an important protective function competing for nutrients and receptors with pathogenic bacteria. The colonization of this microbiota starts in the newborn child and achieves stability around the second year of life, with consequence for the health of children and adults. The differences in the microbiota composition are related to different levels of environmental contamination and different endogenous factors. The aim of our study was to analyze the fecal microbiota of children ranging from 2<sup>o</sup> days to 1<sup>o</sup> year old living in low socioeconomic status in São Paulo, Brazil. We collected fecal samples of healthy children at the following points after birth: 2<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> days, 1 month, 3 months, 6 months and one year of life. Bacterial DNA was extracted directly from stool samples, and the *16S rRNA* libraries were made using 2 bacterium-specific primers. The clones were randomly selected, and partially sequenced and analyzed based on *16S rRNA* libraries. The main phylogenetic groups identified were *Escherichia*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Bacteroides* ranging from the 1<sup>o</sup> to 30<sup>o</sup> days of life. From the third month *Streptococcus* and uncultured bacteria, and, besides, *Escherichia* gender gained relevance in the microbiota. These data together with nutritional information, environmental and clinical intercurrents suggest the influence of interpersonal and environmental contamination in the increase of complexity in fecal microbiota composition. This molecular approach allowed the fecal microbiota analysis. This bacterial profile is different from described in developed countries.

**Keywords:** Fecal microbiota. *16S rRNA* libraries. Phylogenetic Analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática do vetor de clonagem <i>pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO</i> empregado para construção da biblioteca 16s rRNA (adaptado de manual <i>TOPO TA Cloning</i> ).	<b>36</b>
<b>Figura 2</b>	Análise da distribuição dos gêneros bacterianos identificados nas bibliotecas 16S rRNA das amostras fecais das crianças em cada ponto de tempo estudado, em abundância relativa.	<b>42</b>
<b>Figura 3</b>	Variação da abundância relativa observada entre os diferentes pontos de tempo estudados.	<b>42</b>
<b>Figura 4</b>	Variação da frequência de colonização observada entre os diferentes pontos de tempo estudados.	<b>43</b>
<b>Figura 5</b>	Perfil da microbiota fecal das crianças amamentadas com leite materno exclusivamente até o quinto mês de vida.	<b>51</b>
<b>Figura 6</b>	Perfil da microbiota fecal das crianças com alimentação mista antes do quinto mês de vida.	<b>52</b>
<b>Figura 7</b>	Curva de rarefação das bibliotecas <i>16S rRNA</i> de dois dias, sete dias e trinta dias.	<b>57</b>
<b>Figura 8</b>	Curva de rarefação das bibliotecas <i>16S rRNA</i> de três meses, seis meses e doze meses.	<b>57</b>
<b>Figura 9</b>	Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de dois, sete e trinta dias .	<b>59</b>
<b>Figura 10</b>	Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de três, seis e doze meses.	<b>60</b>
<b>Figura 11</b>	Árvore filogenética das bibliotecas <i>16S rRNA</i> do 2 <sup>o</sup> , 7 <sup>o</sup> e 30 <sup>o</sup> dias.	<b>63</b>
<b>Figura 12</b>	Árvore filogenética das bibliotecas <i>16S rRNA</i> do 3 <sup>o</sup> , 6 <sup>o</sup> e 12 <sup>o</sup> mês .	<b>64</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Iniciadores e condições utilizados nos ensaios de PCR para amplificação das regiões 16S.	<b>34</b>
<b>Tabela 2</b>	Relação dos pontos de análise com o seu período correspondente, número de crianças estudadas e quantidade de clones sequenciados por ponto de análise.	<b>40</b>
<b>Tabela 3</b>	Abundância relativa e frequência de colonização total de gêneros bacterianos dos 3.990 clones analisados.	<b>41</b>
<b>Tabela 4</b>	Abundância relativa e frequência de colonização total de gêneros bacterianos classificados como “raros” dos 3.990 clones analisados.	<b>41</b>
<b>Tabela 5</b>	Abundância relativa nos pontos de análise estudados.	<b>43</b>
<b>Tabela 6</b>	Frequência de colonização nos pontos de análise estudados.	<b>44</b>
<b>Tabela 7</b>	Prevalência e abundância da microbiota fecal em crianças amamentadas com leite materno exclusivo até o quinto mês de idade.	<b>54</b>
<b>Tabela 8</b>	Prevalência e abundância da microbiota fecal em crianças com alimentação mista antes do quinto mês de vida.	<b>54</b>
<b>Tabela 9</b>	Índices de riqueza (Ace e Chao), diversidade (Simpson e Shannon) e cobertura, sob um cutoff de 95% (Gênero). Para os grupos de 2, 7 e 30 dias.	<b>56</b>
<b>Tabela 10</b>	Índices de riqueza (Ace e Chao), diversidade (Simpson e Shannon) e cobertura, sob um cutoff de 95% (Gênero). Para os grupos de 3, 6 e 12 meses.	<b>56</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CSEB</b>	Centro de Saúde-Escola Butantan
<b>DGGE</b>	Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturante
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>FISH</b>	Hibridização Fluorescente in-sito
<b>HU-USP</b>	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>NLR</b>	Nod-Like receptor
<b>OTU</b>	Unidade Taxonômica Operacional
<b>PAMP</b>	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
<b>PCR</b>	Reação de Polimerização em Cadeia
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PhPh</b>	Eletropherogram Quality Analysis
<b>PRR</b>	Receptores de Reconhecimento de Padrões
<b>qPCR</b>	Reação de Polimerização em Cadeia Quantitativo
<b>RDP</b>	Ribosomal Database Project
<b>rRNA</b>	Ácido Ribonucleico Ribossomal
<b>SDS</b>	Duodecilsulfato de Sódio
<b>TGI</b>	Trato Gastro Intestinal
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	Microbiota intestinal	13
1.2	Imunomodulação	17
1.3	Leite materno	21
1.4	Ferramentas moleculares para a identificação da microbiota fecal	23
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1	Delineamento experimental	28
3.2	Considerações éticas	30
3.3	Origem das amostras	30
3.4	Local de estudo	31
3.5	Acompanhamento dos indivíduos e registro de informações	31
3.6	Métodos	32
3.6.1	Coleta do material clínico	32
3.6.2	Extração de DNA	33
3.6.3	Amplificação da Região 16S rRNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	34
3.6.4	Biblioteca 16S rRNA	35
3.6.5	Análises estatísticas utilizando ferramentas de bioinformática	36
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>
4.1	Construção das bibliotecas 16S rRNA.	39
4.1.1	Análise da microbiota das crianças com 48 horas de vida	44
4.1.2	Análise da microbiota das crianças com 7 dias de vida	45
4.1.3	Análise da microbiota das crianças com 1 mês de vida	45
4.1.4	Análise da microbiota das crianças com 3 meses de vida	46
4.1.5	Análise da microbiota das crianças com 6 meses de vida	46
4.1.6	Análise da microbiota das crianças com 12 meses de vida	47
4.2	Perfil da microbiota fecal de acordo com oferta de leite materno	48
4.3	Análises estatísticas	55
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>83</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>89</b>
	Anexo 1 - Comitê de Ética (Hospital Universitário - USP)	89
	Anexo 2 - Comitê de Ética (Hospital das Clínicas - USP)	90
	Anexo 3 - Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido	91

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal, adquirida no período pós-natal, é composta por grande diversidade de bactérias e desempenha diferentes funções no hospedeiro humano. O conteúdo bacteriano intestinal, ainda não totalmente conhecido, é influenciado por fatores internos e principalmente externos que modulam sua composição e sua função. Componentes específicos da microbiota intestinal são associados a efeitos benéficos para o hospedeiro, como modulação imunológica e antagonismo contra patógenos, além de contribuir para o processo de nutrição e metabolismo.

O processo de instalação da microbiota, que se inicia na criança recém-nascida, alcança estabilidade em torno do 2º ano de vida e é prioritário para a obtenção de uma microbiota "saudável" com consequência para a saúde da criança e do adulto (TANNOCK, 2001).

O trato gastrointestinal (TGI) alberga o maior número e a maior diversidade de espécies bacterianas que colonizam o corpo humano. Embora as bactérias possam ser encontradas em todo o TGI, o maior número de bactérias reside no cólon e no ceco. A população microbiana do TGI varia de  $10^{11}$  a  $10^{14}$  UFC/mL no conteúdo intestinal. Estima-se a existência de aproximadamente 400 a 1.000 espécies diferentes de micro-organismos, a maioria bactérias (MAGALHAES *et al.*, 2007).

Mais de 99% da microbiota fecal cultivável é representada por apenas 30-40 espécies bacterianas, o que reflete a dificuldade ainda existente em se conhecer a

diversidade de micro-organismos que residem no TGI. Avanços neste campo de conhecimento foram obtidos com a utilização dos métodos moleculares, permitindo a identificação de bactérias não cultiváveis (SCHIFFRIN & BLUM, 2002).

A microbiota bacteriana intestinal tem papel fundamental na proteção ecológica do hospedeiro, impedindo o estabelecimento de bactérias patogênicas. As bactérias da microbiota inibem o crescimento de bactérias patogênicas (antagonismo), produzindo substâncias antimicrobianas, além de competirem por nutrientes e sítios de adesão. Este fenômeno é conhecido como “resistência à colonização” (TANNOCK, 2001).

Outra função atribuída à microbiota intestinal está relacionada à sua contribuição para a nutrição e o metabolismo do hospedeiro. Esta contribuição pode ser evidenciada pela sua capacidade de interferir no pH e na motilidade intestinal, favorecendo a absorção de íons e água e na diferenciação de células da mucosa. A microbiota ainda exerce atividade bioquímica, produzindo vitaminas do complexo B e K as quais são utilizadas pelo hospedeiro (GROLUND *et al.*, 1999). Além disso, a microbiota degrada carboidratos ingeridos pela alimentação, produzindo substratos absorvidos pela célula intestinal do hospedeiro (HOOPER, 2009). Foi demonstrado que alguns micro-organismos da microbiota intestinal são capazes de produzir grandes variedades de ácidos graxos bioativos e metabólitos, tais como o ácido linoleico conjugado (CLA), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), gama-amino ácido butírico, que têm mostrado grande potencial no tratamento de doenças como câncer, obesidade e doenças cardiovasculares. Um papel fundamental dos ácidos graxos de cadeia curta na fisiologia do cólon é o seu efeito trófico sobre o epitélio intestinal, além de estimular a proliferação e a diferenciação das células epiteliais (WALL *et al.*, 2009).

Ao nascimento, as mucosas do recém-nascido são estéreis. A colonização ocorre progressivamente após o parto. No intestino, a população microbiana inicial é bastante heterogênea. Mecanismos regulatórios gerados dentro dos habitats (como imunidade e condições físico-químicas do meio) e forças externas (tipos de nutrientes, contaminação ambiental e uso de antimicrobianos) permitem a presença continuada de alguns tipos de micro-organismos e a eliminação de outros. Posteriormente, a composição da microbiota se torna mais estável e a comunidade bacteriana normal do adulto é alcançada (comunidade clímax) (TANNOCK, 2001). As crianças atingirão uma microbiota com características de adulto ou comunidade clímax em torno dos 2 anos de idade. A partir deste período, embora a microbiota intestinal permaneça em interação permanente com micro-organismos do meio ambiente, sua composição se mantém estável. Alterações neste equilíbrio poderão ser observadas em condições patológicas, como por ocasião de infecções intestinais, uso de antibióticos e tratamento imunossupressor (TRABULSI *et al.*, 2004; PENDERS, 2007).

De maneira geral, as bactérias anaeróbias facultativas, como *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*, são as primeiras bactérias a colonizarem o TGI do recém-nascido, devido ao elevado teor de oxigênio que existe inicialmente. À medida que estas bactérias consomem o oxigênio, o meio se torna mais adequado para as bactérias anaeróbias estritas (*Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium*). Depois disso, pouco se sabe sobre a identidade e a época de entrada dos outros componentes do ecossistema digestivo (ADLERBERTH, 1999).

Fatores internos e externos interferem no processo de colonização da mucosa intestinal (TANNOCK, 1999 e 2001). Os fatores internos estão relacionados às condições do hospedeiro, tais como desenvolvimento anatômico do TGI,



movimentos peristálticos, ácidos biliares, pH intestinal e resposta imune, assim como contemplariam as interrelações microbianas, quantidade e qualidade dos receptores de mucosa e terapias medicamentosas. Os fatores externos dependem do ambiente ao qual este hospedeiro está inserido e incluem carga de bactérias do meio ambiente, composição da microbiota materna, forma de nascimento e alimentação (FANARO *et al.*, 2003).

Para colonizar permanentemente um sítio do intestino, que caracteristicamente tem elevada atividade peristáltica, a maioria das bactérias precisa aderir firmemente ao epitélio da mucosa. Os componentes dos ecossistemas bacterianos competem para ocupar os receptores em diferentes sítios de adesão (FANARO *et al.*, 2003).

A microbiota intestinal é composta por micro-organismos residentes chamados indígenas ou autóctones, que convive harmonicamente com o hospedeiro, tornando-se patogênica somente quando o ecossistema é perturbado de alguma forma. Bactérias que apenas passam pelo TGI provenientes do meio ambiente, mas que não têm capacidade ou não encontram condições apropriadas para se estabelecerem, são chamadas alóctones. As bactérias alóctones, portanto, não colonizam o intestino, exceto em algumas circunstâncias (LUNDEQUIST *et al.*, 1985). A estabilidade da microbiota é um processo ativamente mantido pelas interrelações entre bactérias e entre estas e o hospedeiro (PENNA *et al.*, 2003).

Como descrito anteriormente, a composição e atividade da microbiota intestinal indígena tem enorme importância nos processos imunológicos, nutricionais e patogênicos no ser humano, com consequência na manutenção da saúde do indivíduo. O conhecimento da microbiota permite a utilização de diferentes estratégias com o intuito de manipular as populações bacterianas e promover a

saúde. Entretanto, a complexa microbiota do adulto é difícil de ser manipulada. Sabe-se que as primeiras bactérias que colonizam o TGI parecem ter importante papel na regulação da colonização subsequente (MACKIE *et al.*, 1999). Essas bactérias iniciais podem modular a expressão gênica das células epiteliais do hospedeiro, criando, assim, um ambiente favorável para elas mesmas e prevenindo o crescimento de outras bactérias introduzidas posteriormente. Desta maneira, a qualidade da colonização inicial do intestino teria, possivelmente, papel crítico no processo de seleção entre os diferentes gêneros bacterianos, trazendo consequências para toda a vida (FURRIE, 2007; GUARNER & MALAGELADA, 2003).

## 1.2 Imunomodulação

A mucosa intestinal humana é a principal interface entre o sistema imunológico e o ambiente externo. A microbiota tem efeito estimulante no desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro. Nos animais de experimentação isentos de bactérias, os nódulos linfáticos são menores e menos frequentes. O efeito estimulante da microbiota no tecido imunológico do hospedeiro está envolvido em aspectos da resistência que são importantes nos estágios iniciais das infecções pelos patógenos. No TGI, existe um estado de modulação imunológica constante. Enquanto o sistema imunológico está pronto para responder contra bactérias patogênicas, também é capaz de manter tolerância em relação à microbiota, que é um processo ativamente mantido (MOUNTTZOURIS *et al.*, 2002; SCHIFFRIN & BLUM, 2002). A microbiota desempenha papel importante no

desenvolvimento e na expansão dos tecidos linfoides e na homeostasia da imunidade intestinal (GASKINS *et al.*, 2008).

A superfície da mucosa intestinal está em contato contínuo com a microbiota, ambos desempenham o importante papel de exercer um efeito barreira impedindo a colonização ou a invasão do hospedeiro por bactérias patogênicas, além de participarem ativamente da imunidade da mucosa, formando a primeira linha de defesa do intestino (SCHIFFRIN & BLUM, 2002).

Uma etapa necessária para a colonização é a capacidade das bactérias de aderirem a superfícies da mucosa. A ligação bacteriana à mucosa intestinal é essencial para que as bactérias resistam ao fluxo de fluido do conteúdo luminal, à contração e ao peristaltismo intestinal. O epitélio intestinal é revestido por um gel de muco protetor composto predominantemente de glicoproteínas, como as mucinas, que oferecem numerosas vantagens ecológicas para as bactérias intestinais. Essas mucinas representam uma fonte direta de carboidratos, peptídeos e nutrientes exógenos, incluindo vitaminas e minerais (GASKINS *et al.*, 2001).

As mucinas são secretadas por células caliciformes, que montam uma camada de muco protetora que se estende até 150  $\mu\text{m}$  a partir da superfície do epitélio. As bactérias são distribuídas por toda a camada de muco exterior, sendo que a camada interna é resistente à penetração de bactérias, definindo uma zona estéril, protegendo a superfície do epitélio intestinal contra invasão dos micro-organismos. Alguns micro-organismos, os patogênicos em particular, estão equipados com fatores de virulência que facilitam a sua penetração nas camadas de muco, permitindo a sua ligação específica à superfície das células epiteliais (HOOPER, 2009; WINKLER *et al.*, 2007).

O sistema imune inato possui receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que têm como alvos estruturas moleculares comuns a grandes grupos de patógenos e não ao hospedeiro. Essas estruturas são denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Membros de várias famílias de proteínas funcionam como PRR que são expressas em células responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo, como as células epiteliais e também as células apresentadoras de antígeno, representadas por macrófagos e células dendríticas (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000).

No intestino, duas classes de receptores têm papel crucial no reconhecimento de patógenos pelo sistema imune de mucosa: os receptores Toll-like (TLR) e Nod (NLR).

Os receptores de conhecimento padrão *Toll-like receptor* (TLR) são moléculas transmembrânicas que contêm um domínio externo à membrana e uma cauda intracelular (WINKLER *et al.*, 2007).

O sistema imunológico inato reconhece um grande número de estruturas moleculares de bactérias, como os componentes da parede bacteriana (lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e ácidos lipoteicoicos) e a flagelina, componente do flagelo bacteriano. Diferentes estruturas ativam diferentes TLR: o TLR2 reconhece peptidoglicanos e ácido lipoteicoico; o TLR3 reconhece RNA-dupla-fita, comuns em vírus; o TLR4 é o receptor de lipopolissacarídeos (LPS), o principal componente da parede de bactérias Gram-negativas; e o TLR5 reconhece a flagelina. A ligação de componentes dos micro-organismos com esses receptores induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas que transduzem o sinal, ativando quinases e fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B e STAT-1, com

subsequente produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (BEDANI & ROSSI, 2009).

As células epiteliais do intestino humano e as células da lâmina própria expressam TLR3 e TLR5, porém pouco TLR2 e TLR4. Estudos mostraram que TLR2 e TLR4 são expressos apenas em células epiteliais das criptas e que esta expressão foi perdida com a maturação das células no lúmen intestinal. A falta de TLR2 de TLR4 e do co-receptor CD14 (necessário para resposta ao LPS), e outras moléculas nas células epiteliais, provavelmente explica a ausência de resposta imunológica ao LPS das bactérias comensais. Porém, a presença de TLR5 permitiria ao epitélio intestinal responder às infecções mediadas por bactérias comensais flageladas, bem como às bactérias enteropatogênicas (WINKLER *et al.*, 2007; FURRIE *et al.*, 2007). No entanto, foi demonstrado que o receptor TLR5 é expresso apenas na região basolateral das células intestinais, evitando assim o reconhecimento das bactérias comensais (GEWIRTZ *et al.*, 2001).

Os receptores NOD (NLR), que estão localizados no citosol celular, NOD1 e NOD2, estão envolvidos no reconhecimento de peptídeoglicanos, um importante componente da parede celular bacteriana. O estímulo destas proteínas, de maneira similar aos TLR, induz a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (MAGALHAES *et al.*, 2007).

Análises genéticas e bioquímicas têm revelado que as proteínas NLR participam do reconhecimento da imunidade inata de maneira independente dos TLR, embora esses dois tipos de receptores possam cooperar para otimizar a resposta contra produtos microbianos (TANABE, 2004).

Uma vez no microambiente intestinal, a sinalização via TLR parece ser regulada negativamente para evitar a inflamação induzida por bactérias comensais,

enquanto os receptores NLR parecem desempenhar papel crucial no reconhecimento apenas de patógenos específicos com fenótipo invasivo.

Além disso, as células dendríticas têm a capacidade de capturar as bactérias no lúmen intestinal e induzir a produção de células B e IgAs bactéria específica, que limitam a invasão bacteriana pelo epitélio intestinal. Deste modo, o sistema imunológico inato e adaptativo utiliza mecanismos para a detecção de bactérias e colabora para limitar o acesso ao epitélio intestinal. Embora as bactérias simbióticas sejam toleradas no lúmen intestinal, as mesmas são rapidamente fagocitadas e eliminadas por macrófagos e células dendríticas residentes quando atravessam a barreira epitelial. Estes mecanismos são importantes para manter a simbiose, sem causar danos à saúde do hospedeiro (HOOPER, 2007).

### **1.3 Leite materno**

Algumas características fazem com que determinadas bactérias sejam consideradas benéficas para os seres humanos. As bifidobactérias e os lactobacilos talvez sejam os principais representantes entre as bactérias benéficas. São micro-organismos que não apresentam nenhum fator de patogenicidade para o ser humano e nunca foram envolvidos em episódios infecciosos no trato gastrointestinal. Alguns fatores favorecem a implantação destas bactérias no TGI dos recém-nascidos, como o “fator bífido” (oligossacarídeos), presentes em quantidade elevada somente nas secreções lácteas humanas.

O fator bífido é utilizado por bactérias bífidas, podendo ser considerado, portanto, como fator de crescimento que favorece a implantação específica dessas bactérias no trato digestivo do recém-nascido humano. Uma vez instaladas,

juntamente com a baixa capacidade tamponante do leite humano, permitem também a melhor atuação das bactérias produtoras de ácido lático, devido a redução do pH intestinal, tornando o ambiente desfavorável ao crescimento de microrganismos patogênicos (MacFARLANE; CUMMINGS, 2000).

Muitos fatores de proteção não específicos são encontrados no leite humano. A lactoferrina é uma proteína que age como agente bacteriostático, privando os micro-organismos de ferro, além de exercer atividade bactericida, antiviral, anti-inflamatória e imunomodulatória. A lisozima é um componente proteico encontrado em grande quantidade no leite humano, que promove a lise de bactérias e pode exercer efeito imunomodulatório pela liberação de elementos da parede celular bacteriana (HAMOSH, 1998).

Evidências indicam a existência de inúmeros outros fatores de proteção no leite materno, como gangliosídeos, fator de resistência, interferon, fibronectina e glicosaminoglicanas (LONNERDAL, 2003).

Os fatores imunomodulatórios presentes no leite materno incluem prolactina, lactoferrina e citocinas, que, em adição às suas outras funções biológicas e antimicrobianas, são capazes de regular ativamente a síntese e o amadurecimento do sistema imunológico do recém-nascido. Essa atividade estimula a proliferação de linfócitos e a produção de imunoglobulinas, aumentando a atividade celular. Os fatores anti-inflamatórios incluem antiproteases, interleucinas, prostaglandinas, acetil-hidrolase de fatores ativantes de plaquetas, IgA secretora e antioxidantes, como vitaminas e peroxidases (LONNERDAL, 2003).

#### 1.4 Ferramentas moleculares para a identificação da microbiota fecal

A maioria dos estudos da microbiota intestinal fazia uso de métodos convencionais dependentes de cultivo em meios seletivos. Até o final dos anos 1990, a microbiota intestinal humana era tradicionalmente avaliada pela análise de isolados a partir de métodos de culturas de anaeróbios estritos e facultativos. Contudo, bactérias cultiváveis representam 20 a 30% do total de bactérias encontradas na mucosa intestinal (HAYASHI *et al.*, 2003). Entre os fatores limitantes desses métodos podem-se citar a baixa sensibilidade e a baixa reprodutibilidade, além do longo tempo consumido para as análises e a recuperação de apenas espécies cultiváveis. Como resultado do uso desses métodos convencionais, pode ocorrer a superestimação ou a subestimação da quantidade de algumas espécies (FURRIE, 2007).

Com o advento da biologia molecular, várias técnicas de identificação bacteriana têm surgido ao longo das últimas décadas, permitindo diagnósticos mais rápidos, precisos e seguros.

As técnicas moleculares têm contribuído para a aplicação de métodos rápidos e independentes de cultivo e revelado grande diversidade da microbiota nas amostras analisadas. Análises filogenéticas baseadas em PCR (clones estratégicos) têm sido utilizadas para caracterizar a microbiota de fezes humana. A biblioteca de 16S *rRNA* (RNA ribossomal) vem demonstrando ser uma ótima técnica molecular para evidenciar a composição da microbiota intestinal (FURRIE, 2007; TANNOCK, 2001).

Ribossomos procariotos contêm duas subunidades, 50S e 30S. A subunidade 50S contém 34 proteínas e as moléculas de *rRNA* 5S e 23S *rRNA*. A subunidade



30S contém 21 proteínas e a molécula de *rRNA* 16S. O *rRNA* 16S tem sido a molécula mais amplamente empregada para desenvolver a filogenia dos procariotos (BLAUT *et al.*, 2002).

Em particular, a análise da sequência de RNA ribossomal fornece uma ferramenta poderosa para a identificação dos micro-organismos. A alta especificidade e a natureza cumulativa dos bancos de dados de sequências de RNA ribossômicos têm incentivado a descoberta e o reconhecimento desta biodiversidade (FURRIE, 2007).

O gene *rRNA* tem regiões de consenso, que são identificadas por todas as bactérias, e regiões de variabilidade, que são específicas de grupos e espécies particulares. Dentro destas regiões variáveis há também pequenas áreas de hipervariabilidade que podem ser únicas para diferentes cepas de um mesmo organismo. Portanto, a sequência do gene que codifica o *rRNA* pode ser usada para identificar espécies diferentes e cepas de espécie particular dentro de uma comunidade bacteriana mista complexa usando tecnologia em série (FURRIE, 2007).

Por utilização dos ácidos nucleicos derivados diretamente da comunidade microbiana, combinado com reação de polimerase em cadeia (PCR) e clonagem, inúmeros micro-organismos, inclusive os não cultiváveis, tornam-se acessíveis para caracterização e identificação (FURRIE, 2007; HAYASHI *et al.*, 2003). Com o uso destas técnicas moleculares avançadas, nas quais se podem examinar múltiplos organismos de múltiplos doadores, uma descrição exata da complexidade destas comunidades bacterianas pode ser obtida (FURRIE, 2007; TANNOCK, 2001).

Além da técnica de construção de biblioteca do gene 16S *rRNA*, algumas variações das técnicas moleculares foram introduzidas com o objetivo de melhor

entender a dinâmica da microbiota intestinal, como o método de eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE). A técnica de DGGE, quando combinada com o sequenciamento de clones de *16S rRNA*, permite a determinação da taxonomia dos membros de uma comunidade microbiana (FAVIER, 2002). A metodologia de DGGE é baseada na separação dos produtos de PCR por desnaturação da dupla fita dos fragmentos em gel de poliacrilamida contendo gradiente de ureia e formamida. A separação por eletroforese em gel de agarose convencional resulta em uma única banda não descritiva. Com a técnica de DGGE têm-se a separação dos produtos de PCR de acordo com as diferenças nas sequências do fragmento, permitindo a distinção de duas moléculas de DNA bacteriano que possuam apenas uma base diferente (MUYZER, *et al.* 1998).

O método de FISH (Hibridização Fluorescente In-Sito) é baseado na reação em cadeia (PCR) e utiliza sondas de oligonucleotídeos ligadas a um componente fluorescente que hibridiza regiões específicas do *16S rRNA*, podendo ser evidenciadas pela fluorescência. A enumeração desses micro-organismos fluorescentes pode ser feita microscopicamente pela contagem visual ou por análise de imagem (LEVSKY & SINGE, 2003).

Alguns autores utilizam a metodologia de PCR em tempo real (qPCR), com iniciadores específicos, para a detecção de gêneros específicos de bactérias (PENDERS, 2006). Esta técnica tem se mostrado mais sensível que o PCR clássico, inclusive por seu limite de detecção de células bacterianas por grama de amostra fecal ser mais baixo que na técnica convencional (MATHYS *et al.*, 2008).

O conhecimento sobre a formação, a composição e o desenvolvimento da microbiota indígena é ainda bastante incompleto, tanto em âmbito nacional quanto internacional.

A otimização da microbiota intestinal com o uso de pré e probióticos durante o período de colonização intestinal tem sido sugerida; entretanto, ressalta-se a importância de se conhecer mais profundamente como ocorre a instalação da microbiota e quais as consequências em longo prazo de possíveis intervenções neste processo (FANARO, 2003).

A construção de biblioteca *16S rRNA* foi escolhida como metodologia de estudo e é justificada pelo objetivo de analisar a biodiversidade dos constituintes bacterianos das amostras.

Neste estudo, foi comparada a evolução da diversidade bacteriana de um grupo de 10 crianças ao longo de seu primeiro ano de vida, pertencentes a uma mesma comunidade e expostas a condições ambientais diversas.

A importância do tema escolhido para este estudo apoia-se na relevância da microbiota intestinal para a saúde do indivíduo assim como as lacunas no conhecimento do tema.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar a diversidade da microbiota fecal de lactantes em estudo longitudinal no primeiro ano de vida.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Acompanhar a instalação da microbiota intestinal no recém-nascido desde o nascimento até um ano de idade, analisando a composição e a evolução temporal da mesma
- Apontar hábitos e mudanças alimentares – tempo do aleitamento materno, uso de fórmulas artificiais, dieta de desmame (conteúdo e época de introdução da mesma) – e sua possível relação com a colonização intestinal
- Apontar mudanças e fatores ambientais – condições socioeconômicas, intercorrências infecciosas, uso de medicações – que possam interferir na instalação ou estabilidade da microbiota

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental

Após o recebimento das fezes, estas foram fracionadas em alíquotas de 0,2 mg em microtubos e então congeladas em freezer -80 °C até o momento do uso.

A obtenção do DNA do material fecal foi obtido com duas metodologias, as amostras que estavam acondicionadas em tampão TE foram submetidas ao procedimento de extração com protocolo de acordo com Ausubel *et al.* (1999), com algumas modificações. As amostras que foram coletas e congeladas sem acondicionamento em tampão TE foram submetidas ao procedimento de extração utilizando o *kit QIAmp DNA Stool Mini* (Quiagem), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após o procedimento de extração, o DNA obtido foi utilizado como molde para a reação em cadeia da polimerase para amplificação da região gênica 16S *rRNA*. Para confirmar se a região 16S amplificou-se corretamente, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

O amplicon foi purificado e cada amplificação foi clonada em plasmídeo vetor *pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO* (Invitrogen). Aproximadamente 96 clones de cada ponto de análise de cada criança foram selecionados e lisados. O lisado, então, foi utilizado como fonte de DNA molde para reação de amplificação com iniciadores M13. O DNA dos amplicons obtidos foi purificado, quantificado e enviado para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma da Universidade de São Paulo.

No ponto de análise 1, correspondente ao 2º dia de vida, foram analisados 712 clones, com o total de 10 crianças; no ponto de análise 2, correspondente ao 7º dia

de vida, foram analisados 478 clones, com o total de 9 crianças; no ponto de análise 3, correspondente ao 1º mês de vida, foram analisados 575 clones, com o total de 10 crianças; no ponto de análise 4, correspondente ao 3º mês de vida, foram analisados 614 clones, com o total de 8 crianças; no ponto de análise 5, correspondente ao 6º mês de vida, foram analisados 766 clones, com o total de 8 crianças, e, finalmente, no ponto de análise 6, correspondente ao 12º mês de vida, foram analisados 845 clones com o total de 9 crianças.

As sequências obtidas foram examinadas por meio de ferramentas de bioinformática e as sequências com 95% ou mais de similaridade foram designadas como sendo do mesmo gênero (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994).

### **3.2 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 Hospital Universitário (Anexo 1 e 2). As mães foram informadas, através de linguagem clara, sobre os objetivos da pesquisa, os métodos de investigação empregados e da necessidade de acompanhamento periódico de suas crianças. Após esclarecimento verbal realizado pela pesquisadora executante da pesquisa, todas as mães assinaram os termos de consentimento livre e esclarecido para a participação na pesquisa (Anexo 3).

Todas as necessidades da criança durante o período do estudo, no que se refere ao uso de drogas e eventuais mudanças dietéticas, foram respeitadas, sendo este um estudo de observação e não de intervenção.

### **3.3 Origem das amostras**

Este trabalho constitui-se da continuação do Projeto FAPESP n. 06/50298-2, intitulado “Instalação da microbiota intestinal em um grupo de crianças saudáveis: análise do nascimento até um mês de idade”. Neste estudo inicial, foram definidas as crianças a serem analisadas, as técnicas laboratoriais foram padronizadas e os primeiros resultados obtidos de 10 crianças nos períodos de 2, 7 e 30 dias de vida foram analisados, uma vez que este estudo, utilizando metodologia molecular, ainda era inédito no país. Os resultados obtidos com estas 10 crianças justificaram a continuação do estudo.

Os resultados do trabalho citado acima mostraram que as sequências identificadas não obtiveram a representatividade satisfatória dos pontos de análise 1, 2 e 3. Desta forma, aumentamos os clones estudados por criança e realizamos as análises de bioinformática e os testes estatísticos, completando a análise da evolução do estabelecimento da microbiota fecal em crianças até 1 ano de vida. Portanto, os mesmos estão incluídos e discutidos neste trabalho atual.

### **3.4 Local do estudo**

Foram acompanhados 10 lactentes nascidos no Hospital Universitário (HU-USP), durante o período de julho de 2008 a julho de 2009, nascidos por parto natural a termo, com peso entre 2,5 á 4 kg, saudáveis, cujas mães tiveram o exame pré-natal realizado no Hospital Universitário (HU), sem anormalidades.

As análises microbiológicas com ferramentas moleculares foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

### **3.5 Acompanhamento dos indivíduos e registro de informações**

Os lactentes foram acompanhados mensalmente no Ambulatório de Pediatria pela Dra. Filumena Maria da Silva Gomes, no Centro de Saúde-Escola Butantan (CSEB), até os 12 primeiros meses de idade.

O aleitamento natural nos primeiros 6 meses de vida foi estimulado, assim como as mães foram orientadas sobre dieta de transição e preparo de alimentos, conforme é preconizado pela Sociedade Brasileira de Pediatria. Durante estas



consultas mensais, foram coletadas informações concernentes ao desenvolvimento da criança, às intercorrências de saúde, às mudanças alimentares e às alterações na rotina da casa (como aquisição de animal de estimação e piora ou melhora de condições sanitárias da residência).

### **3.6 Métodos**

#### **3.6.1 Coleta do material clínico**

As respectivas mães ou responsáveis foram orientadas a realizar a coleta das fezes recém-emitidas no dia marcado para o retorno no CSEB e acondicioná-las nos frascos coletores. Após a coleta, os frascos coletores eram mantidos sob refrigeração até o momento da consulta. Cada mãe recebia nas consultas os frascos coletores para a próxima coleta, bem como um recipiente de poliestireno expandido (*isopor*) para acondicionar os frascos em gelo durante o trajeto até o CSEB.

As amostras de fezes foram obtidas com duas metodologias. Amostras de 2 dias a 3 meses foram obtidas a partir de coletas pós-evacuação e suspensas em solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6), enquanto as amostras de fezes de 4 a 12 meses foram obtidas a partir de coleta pós-evacuação e mantidas a seco sob refrigeração até o momento da entrega no CSEB.

Após a entrega do material, as fezes foram mantidas a -20°C e, então, enviadas ao Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde foram mantidas a -80°C até o momento do uso.

### 3.6.2 Extração de DNA

A obtenção do DNA do material fecal, que foi suspenso em solução de TE, foi feita de acordo com Ausubel *et al.* (1999), com algumas modificações. Essas amostras de fezes foram fracionadas em alíquotas de 560  $\mu\text{L}$  e acrescidas de 30  $\mu\text{L}$  de duodecilsulfato de sódio (SDS), a 10%, e 6  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20mg/mL). Após homogeneização em vortex, as amostras foram incubadas a 37 °C, por 1h. Após a incubação, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de NaCl (5M) e o tubo foi levemente homogeneizado com as mãos. Adicionaram-se 80  $\mu\text{L}$  de (10% CTAB/ 0,7 M NaCl) e as amostras foram incubadas a 65 °C, por 10 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 720  $\mu\text{L}$  de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 200 g, por 5 minutos, a 4 °C.

Após a centrifugação, 650  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foi adicionado o mesmo volume de solução contendo clorofórmio/álcool isoamílico. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições acima. Este procedimento foi repetido por 4 vezes. O sobrenadante total foi coletado e adicionaram-se 390  $\mu\text{L}$  de isopropanol, o tubo foi levemente homogeneizado e centrifugado a 200 g, por 30 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e as amostras centrifugadas nas mesmas condições acima por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado o sedimento ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril, incubados a 37 °C, por 1 hora, para completa homogeneização, e mantidas a -20 °C até o momento do uso.

O DNA das amostras coletadas a seco foi obtido utilizando-se o *kit QIAmp DNA Stool Mini* (Quiagem) para o isolamento de DNA genômico bacteriano das amostras de fezes, de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.6.3 Amplificação da região 16S *rRNA* 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 16S *rRNA*. Para tanto, foram utilizados iniciadores universais para organismos procariotos do domínio bactéria propostos por Hayashi *et al.* (2003). As sequências dos oligonucleotídeos e as condições da reação estão descritas na Tabela 1.

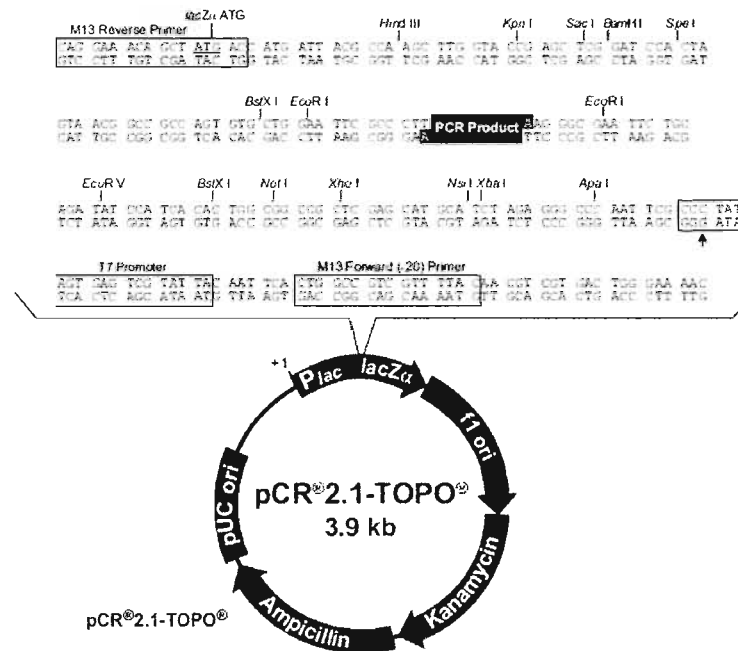
**Tabela 1.** Iniciadores e condições utilizados nos ensaios de PCR para amplificação das regiões 16S.

Iniciador	Sequência 5' - 3'	Tamanho	Ciclo de amplificação
16S -fD1	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	1380pb	5 min 94°, 1 min 94°
16S -rP1	5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3'		50s 57°, 1min e 30s (30 ciclos)

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 100 µL, contendo 180 ng de DNA extraído das amostras fecais. As condições de reação foram as mesmas propostas por Hayashi *et al.* (2003). Os amplicons 16S foram purificados utilizando *kit UltraClean PCR (Invitrogen)*, de acordo com o fabricante, e estocados a -20°C até o momento do uso.

### 3.6.4 Biblioteca 16S rRNA

Os amplicons purificados de cada amplificação foram clonados em plasmídeo vetor *pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO (Invitrogen)* (Figura 1). Bactérias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas com este vetor utilizando-se o *Kit Original TA Cloning (Invitrogen)*. Os clones de cada amplificação foram selecionados em ágar LB contendo kanamicina, na concentração final de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Aproximadamente 200 clones de cada ponto de análise de cada criança foram selecionados e cultivados em meio TSB caldo com kanamicina por 18 h, acrescidos de glicerol e congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para as reações de sequenciamento, 96 clones de cada ponto de análise de cada criança foram cultivados em LB caldo e 1  $\mu\text{L}$  desta cultura foi lisado em água MilliQ, sob fervura, a 15 min, e utilizado como DNA molde em reação de amplificação com iniciadores M13 (Figura 1). Os amplicons obtidos a partir desta reação foram purificados, o DNA quantificado e aliquoteado 5  $\mu\text{L}$  em microtubo de 0,2 mL na concentração mínima de 40  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Cada preparação foi acrescida de 2,5  $\mu\text{L}$  do *primer* T7 (Figura 1) na concentração de 5 mM, para a geração de uma sequência consenso, e enviada para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma da Universidade de São Paulo. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o sistema ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).



**Figura 1.** Representação esquemática do vetor de clonagem *pCR<sup>2.1</sup> TOPO* empregado para construção da biblioteca 16s rRNA (adaptado de manual *TOPO TA Cloning*).

### 3.6.5. Análises estatísticas utilizando ferramentas de bioinformática

Para a análise dos resultados das bibliotecas 16S geradas por sequenciamento, as sequências foram submetidas a um pré-tratamento. Duas abordagens foram utilizadas neste estudo, método baseados em OTU (Unidade Taxonômica Operacional) e teste de hipóteses.

As sequências de 16S RNA geradas por sequenciamento foram examinadas pela ferramenta Phred, disponível *online* no *software* Eletropherogram Quality Analysis (PhPh) da EMBRAPA, para a verificação de qualidade dos esferogramas obtidos. As sequências qualificadas foram editadas manualmente no *software* BioEdit v7.0.5.3 (HALL, 1999) para remover as sequências do vetor e do *primer*. Em seguida, as sequências foram divididas em dois grupos (Forward e Reverse) e renomeadas; somente as sequências no sentido de leitura 5'3' foram analisadas.

Com o auxílio do programa BioEdit, as sequências foram conferidas quanto ao tamanho (número de nucleotídeos), sendo que as sequências muito curtas foram excluídas e as muito compridas foram reduzidas a um número de nucleotídeos comum.

Os artefatos quiméricos foram analisados pelo Chimera Slayer no *software* Mothur v1.13.0 e os mesmos foram excluídos das análises subsequentes. O Mothur também foi utilizado para realizar o alinhamento das sequências, a construção da matriz de distância, o agrupamento das OTU, o cálculo dos índices de diversidade e os testes de hipótese (SCHLOSS *et al.*, 2009).

As sequências das bibliotecas foram alinhadas contra o banco de dados Silva, que contém cerca de 370.000 sequências de bactérias e *Archaea* pré-alinhadas; depois de alinhadas, foram removidos os *gaps* comuns das sequências.

O método baseado em OTU permite analisar os índices de riqueza e a diversidade de uma comunidade bacteriana por uma matriz de distância.

A análise da diversidade calculada pelos índices de Simpson, Shannon e Rarefação se refere à variedade e à complexidade de espécies de uma comunidade. Os índices de diversidade de Simpson, Shannon e Rarefação foram calculados para cada biblioteca. Para o cálculo dos índices foram utilizados como limites de corte os valores de 75%, para o nível taxonômico de filo; 85%, para classe; 95%, para gênero; e 97%, para espécie (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994).

A análise de riqueza compartilhada de Ace e Chao1 avalia a abundância numérica baseada no número de OTU de uma comunidade. Entre os pontos de análise foram calculados os índices de riqueza compartilhada, baseando-se no número de OTU.

Baseada na matriz de distância construída no *software* Mothur, a estrutura da comunidade bacteriana foi comparada entre as bibliotecas dos pontos de análise e ilustradas por diagramas de Venn.

Para estimar as diferenças entre as comunidades, foram realizados os testes de hipótese Libshuff e UniFrac para testar a beta diversidade entre as amostras (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2006). O índice de Libshuff foi calculado a fim de testar estatisticamente se duas ou mais comunidades possuem a mesma estrutura.

A distância UniFrac é baseada no comprimento dos ramos de uma árvore filogenética compartilhada entre duas ou mais comunidades; uma pequena distância entre os ramos mostra se as comunidades estudadas são composicionalmente similares, abrigando linhagens que compartilham uma história evolutiva comum. O teste UniFrac foi realizado para avaliar estatisticamente as diferenças na estrutura das comunidades bacterianas entre os pontos de análise.

Foram separadas as sequências de cada biblioteca; e as sequências de referência correspondentes foram selecionadas para a construção de uma árvore filogenética utilizando o *software* ARB. Para a construção da árvore foi estabelecido um filtro de posições, a partir das sequências alinhadas, no qual foi estabelecido um limiar mínimo de 50% de bases por coluna de alinhamento. O método empregado na construção da árvore foi o Neighbor Joining, com a correção de Felsenstein no *software* ARB com 1.000 repetições (apenas valores  $\geq 50\%$  para as regiões ultraperiféricas foram utilizados) (KIMURA, M. 1980).

O resultado do sequenciamento foi comparado com as sequências *16S rRNA* existentes no banco de genes GenBank do NCBI (PEARSON, 1988). As sequências com 97% ou mais de similaridade foram designadas como sendo do mesmo gênero (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Construção das bibliotecas 16S rRNA

O perfil da microbiota fecal do primeiro ano de vida do grupo de crianças incluídas neste estudo foi analisado com os resultados da identificação de 3.990 sequências do gene 16S rRNA. Estas sequências foram utilizadas para a construção das bibliotecas de cada ponto de análise e para a determinação da abundância relativa e da frequência de colonização dos gêneros bacterianos obtidos. Aproximadamente 700 clones foram obtidos em cada ponto de análise.

A análise filogenética das sequências identificou 6 filos: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Verrucomicrobia*. A identificação das sequências obtidas foi realizada a partir do alinhamento destas sequências juntamente com as sequências de referência extraídas dos bancos de dados RDP e BLAST. Para a análise das sequências obtidas no período de 2 dias a 1 mês foram utilizadas 30 sequências de referência. Para o período de 3 meses a 1 ano foram utilizadas 70 sequências de referência. O gênero *Escherichia* foi o mais frequente, com 518 clones no período de 2 a 30 dias e 401 clones no período de 3 a 12 meses (Figura 11 e 12).

As sequências obtidas foram agrupadas por pontos de análise, com número de amostras diferentes em cada um deles. O ponto de análise 1 corresponde ao 2º dia de vida, o ponto 2 ao 7º, o ponto 3 ao 30º, o ponto 4 ao 3º mês de vida, o ponto 5 ao 6º e, finalmente, o ponto 6 ao 12º (Tabela 2).



**Tabela 2.** Relação dos pontos de análise com o seu período correspondente, número de crianças estudadas e quantidade de clones sequenciados por ponto de análise

Ponto de análise	Período	Nº de crianças	Nº de Clones
1	2 dias	10 crianças	712
2	7 dias	9 crianças	478
3	30 dias	10 crianças	575
4	3 meses	7 crianças	615
5	6 meses	9 crianças	766
6	12 meses	9 crianças	854
<b>Total</b>			<b>3.990</b>

O percentual de seqüências obtidas, para um determinado gênero bacteriano, em relação ao número total de seqüências obtidas em cada ponto de tempo estudado, representa a abundância relativa de cada gênero bacteriano identificado, enquanto que a frequência de colonização é o percentual de crianças nas quais foi detectado o gênero bacteriano específico. Os resultados obtidos foram agrupados para análise da abundância relativa e da frequência de colonização e encontram-se representados nas Figuras 2, 3 e 4 e nas Tabelas 5 e 6.

A Tabela 3 mostra o percentual de frequência de colonização e de abundância relativa referente aos 3.990 clones identificados em todos os pontos de análise. O gênero bacteriano mais abundante é o *Escherichia* (40%), seguido de bactérias não cultiváveis (20%) e *Streptococcus*, com 10% de abundância relativa, e estão presentes em 100% das crianças. Os demais gêneros apresentam abundância relativa inferior a 10%.

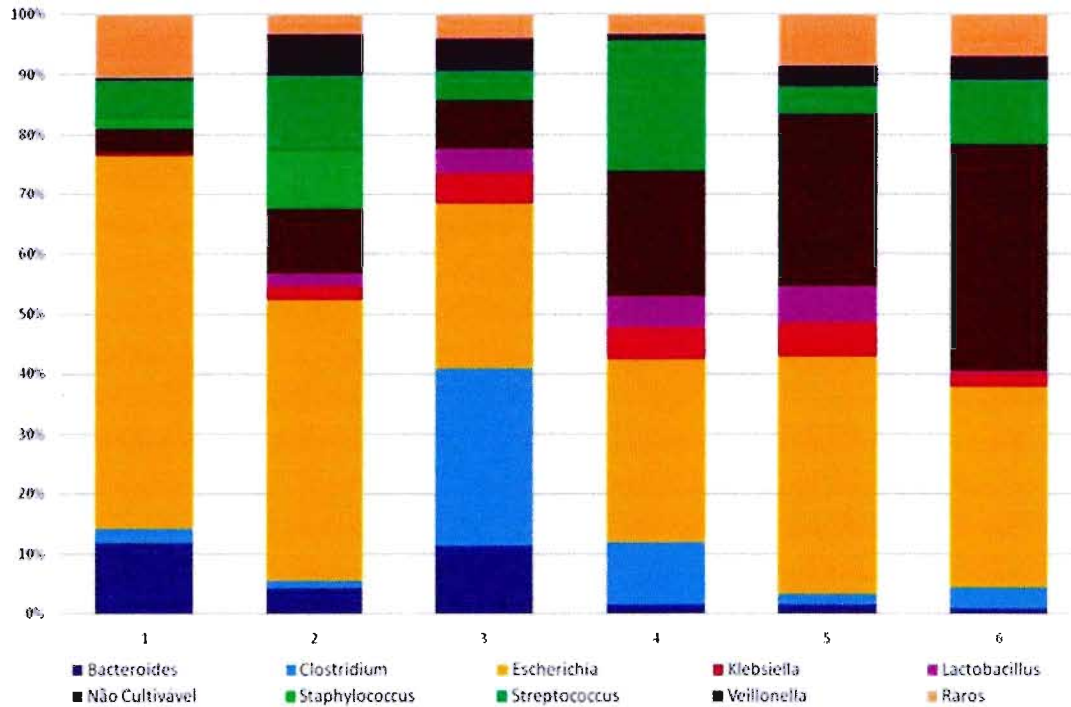
**Tabela 3.** Abundância relativa e frequência de colonização total de gêneros bacterianos dos 3.990 clones analisados

Gênero bacteriano	Abundância relativa	Frequência de colonização
<i>Bacteroides</i>	5%	80%
<i>Clostridium</i>	8%	90%
<i>Escherichia</i>	40%	100%
<i>Klebsiella</i>	3%	90%
<i>Lactobacillus</i>	3%	80%
Não cultivável	20%	100%
<i>Staphylococcus</i>	1%	40%
<i>Streptococcus</i>	10%	100%
<i>Veillonella</i>	3%	80%
Raros *	6%	100%

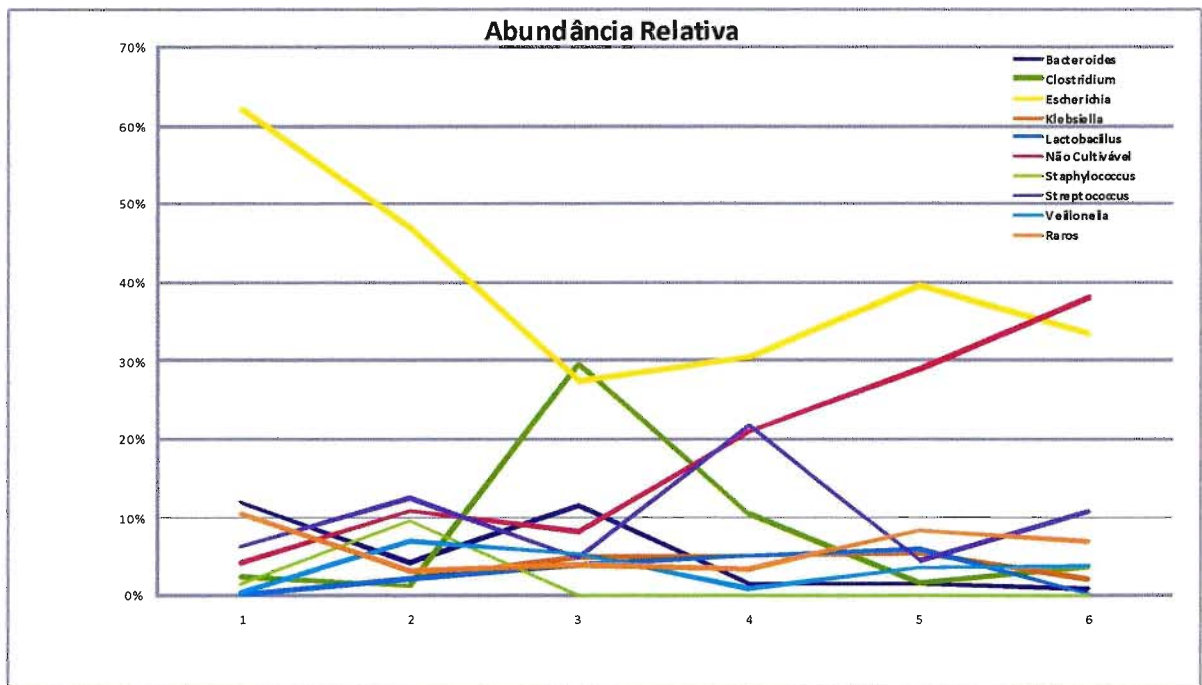
Os gêneros identificados com a frequência de colonização inferior a 10% em todos os pontos de análise foram agrupados e denominados como "raros", estando representados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Abundância relativa e frequência de colonização total de gêneros bacterianos classificados como "raros" dos 3.990 clones analisados

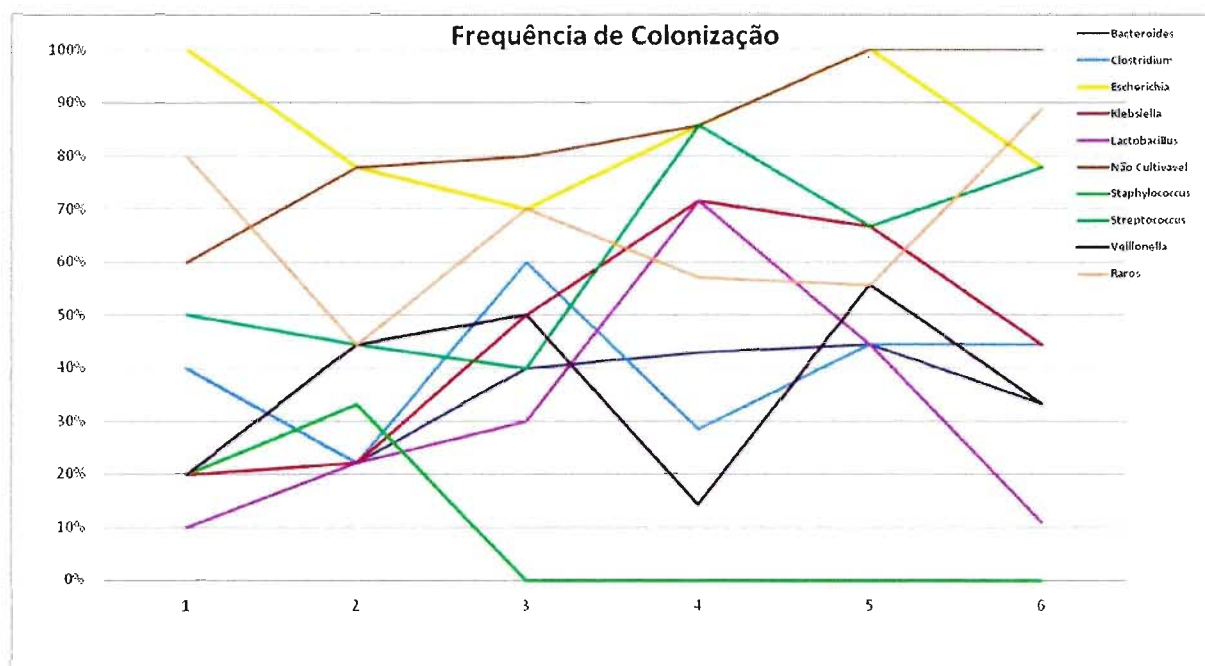
*Raros	Abundância relativa	Frequência de colonização
<i>Acinetobacter</i>	3%	30%
<i>Akkermansia</i>	12%	50%
<i>Bifidobacterium</i>	2%	10%
<i>Citrobacter</i>	5%	40%
<i>Cronobacter</i>	1%	10%
<i>Megasphaera</i>	1%	40%
<i>Enterococcus</i>	10%	40%
<i>Eubacterium</i>	2%	80%
<i>Gemella</i>	1%	10%
<i>Lactococcus</i>	0,5%	10%
<i>Leclercia</i>	1%	30%
<i>Leuconostoc</i>	1%	20%
<i>Parabacteroides</i>	1%	20%
<i>Prevotella</i>	5%	30%
<i>Rahnella</i>	3%	10%
<i>Ruminococcus</i>	0,5%	10%
<i>Pectobacterium</i>	0,5%	10%
<i>Pantoea</i>	4%	30%
<i>Dialister</i>	2%	30%



**Figura 2.** Análise da distribuição dos gêneros bacterianos identificados nas bibliotecas *16S rRNA* das amostras fecais das crianças em cada ponto de tempo estudado, em abundância relativa. 1 (2 dias de vida); 2 (7 dias de vida); 3 (30 dias de vida); 4 (3 meses de vida); 5 (6 meses de vida); 6 (12 meses de vida).



**Figura 3.** Variação da abundância relativa observada entre os diferentes pontos de tempo estudados. 1 (2 dias de vida); 2 (7 dias de vida); 3 (30 dias de vida); 4 (3 meses de vida); 5 (6 meses de vida); 6 (12 meses de vida).



**Figura 4.** Variação da frequência de colonização observada entre os diferentes pontos de tempo estudados. 1 (2 dias de vida); 2 (7 dias de vida); 3 (30 dias de vida); 4 (3 meses de vida); 5 (6 meses de vida); 6 (12 meses de vida).

**Tabela 5.** Abundância relativa nos pontos de análise estudados

Bactérias	Pontos de análise					
	1	2	3	4	5	6
<i>Bacteroides</i>	12%	4%	11%	2%	2%	1%
<i>Clostridium</i>	2%	1%	30%	10%	2%	4%
<i>Escherichia</i>	62%	47%	27%	30%	40%	33%
<i>Klebsiella</i>	1%	2%	5%	5%	6%	2%
<i>Lactobacillus</i>	1%	2%	4%	5%	6%	1%
<i>Não cultivável</i>	4%	11%	8%	21%	29%	38%
<i>Staphylococcus</i>	2%	10%				
<i>Streptococcus</i>	6%	13%	5%	22%	5%	11%
<i>Veillonella</i>	0,5%	7%	5%	1%	4%	4%
<i>Raros*</i>	11%	3%	4%	3%	8%	7%

**Tabela 6.** Frequência de colonização nos pontos de análise estudados

Bactérias	Pontos de análise					
	1	2	3	4	5	6
<i>Bacteroides</i>	40%	22%	40%	43%	44%	33%
<i>Clostridium</i>	40%	22%	60%	29%	44%	44%
<i>Escherichia</i>	100%	78%	70%	86%	100%	78%
<i>Klebsiella</i>	20%	22%	50%	71%	67%	44%
<i>Lactobacillus</i>	10%	22%	30%	71%	44%	11%
Não cultivável	60%	78%	80%	86%	100%	100%
<i>Staphylococcus</i>	20%	33%				
<i>Streptococcus</i>	50%	44%	40%	86%	67%	78%
<i>Veillonella</i>	20%	44%	50%	14%	56%	33%
Raros*	80%	44%	70%	57%	56%	89%

#### 4.1.1 Análise da microbiota das crianças com 48 horas de vida

No ponto de análise 1, correspondente ao segundo dia de vida, pode-se observar um perfil inicial de colonização, com predomínio do gênero *Escherichia*, representado por 62% das sequências obtidas com 100% de frequência de colonização (Figura 2, Tabelas 5 e 6). Outros micro-organismos anaeróbios facultativos também foram identificados, como *Enterobacter* (abundância relativa 8% e frequência de colonização 40%) e *Citrobacter* (1% e 10%). Micro-organismos Gram-positivos, como *Streptococcus* (6% e 50%) e *Staphylococcus* (2% e 20%), estavam presentes em menores proporções. Bactérias anaeróbias estritas como *Bacteroides* (12% e 40%) e *Clostridium* (2% e 40%), também foram identificadas. *Lactobacillus* (1% e 10%) e micro-organismos não cultiváveis (4% e 60%) também foram encontrados colonizando o trato gastrointestinal neste período, embora em pequenas proporções.

#### 4.1.2 Análise da microbiota das crianças com 7 dias de vida

No 7º dia de vida (Figura 2, Tabelas 5 e 6), podemos ainda verificar o predomínio do gênero *Escherichia* (47% e 78%), porém, em menor escala do que demonstrado no 2º dia de vida. Quanto aos demais gêneros, exceto *Bacteroides* (4% e 22%) e *Clostridium* (1% e 22%), observa-se o aumento da colonização, em relação ao segundo dia, demonstrado por *Veillonella* (7% e 44%), *Streptococcus* (13% e 44%), *Staphylococcus* (10% e 33%), *Klebsiella* (2% e 22%), *Lactobacillus* (2% e 22%) e bactérias não cultiváveis (11% e 78%).

#### 4.1.3 Análise da microbiota das crianças com um mês de vida

Com um mês de vida (Figura 2, Tabelas 5 e 6), podemos verificar a distribuição mais homogênea dos gêneros identificados. Pode-se destacar o aumento significativo, tanto em abundância como em frequência, de bactérias anaeróbias pertencentes aos gêneros *Clostridium* (30% e 60%) e *Bacteroides* (11% e 40%) em relação aos outros pontos de análise. O segundo gênero mais frequente neste ponto é o *Escherichia* (27% e 70%). As bactérias pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Veillonella*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* possuem abundâncias relativas semelhantes (4% em *Lactobacillus*, 5% nas demais); porém, com frequências de colonização diferentes, 50% *Klebsiella* e *Veillonella*, 40% *Streptococcus* e 30% *Lactobacillus*.

#### 4.1.4 Análise da microbiota das crianças com três meses de vida

No terceiro mês de vida (Figura 2, Tabelas 5 e 6), observa-se ainda presença do gênero *Escherichia* (30% e 86%) como predominante e o aumento significativo do gênero *Streptococcus* (22% e 86%), que se tornou o segundo gênero mais frequente, caracterizando uma contaminação na microbiota fecal proveniente do contato interpessoal e do ambiente externo. Verificamos que neste ponto ocorreu a redução dos micro-organismos anaeróbios, em especial dos gêneros *Clostridium* (10% e 29%) e *Bacteroides* (2% e 43%). Em oposição, é possível observar o aumento das bactérias não cultiváveis (21% e 86%). Os *Lactobacillus* (5% e 71%), assim como o gênero *Klebsiella* (5% e 71%), mantiveram crescimento constante até este ponto de análise.

#### 4.1.5 Análise da microbiota das crianças com seis meses de vida

No sexto mês de vida (Figura 2, Tabelas 5 e 6), pode-se observar o predomínio do gênero *Escherichia*, com 40% de abundância relativa e 100% de frequência de colonização.

Diferentemente do perfil observado no ponto de análise anterior, há o aumento significativo das bactérias não cultiváveis (29% e 100%), porém, ocorreu a diminuição do gênero *Streptococcus* (5% e 67%).

Os microrganismos *Klebsiella* (6% e 67%), *Lactobacillus* (6% e 44%), *Veillonella* (1% e 50%), *Bacteroides* (1% e 50%) permaneceram com perfis semelhantes em relação ao terceiro mês de vida. Os micro-organismos agrupados

como “raros” foram identificados com 8% e 56% de abundância relativa e de frequência de colonização neste ponto, respectivamente.

#### 4.1.6 Análise da microbiota das crianças com doze meses de vida

Com um ano de idade (Figura 2, Tabelas 5 e 6), podemos observar o aumento na complexidade da composição da microbiota fecal, representada pela elevada colonização por bactérias não cultiváveis (38% e 100%) e dos micro-organismos classificados como “raros” (7% e 100%). Os gêneros mais abundantes e mais frequentes destes micro-organismos classificados como raros são: *Akkermancia*, *Citrobacter* e *Ruminococcus*. É possível observar novamente a colonização pelo gênero *Clostridium*, com 4% de abundância relativa e 44% de frequência de colonização. O gênero *Lactobacillus* apresentou redução acentuada dos percentuais, com 1% de frequência de colonização e 11% de abundância relativa.

O gênero *Klebsiella* (2% e 44%) apresentou decréscimo de sua colonização; enquanto houve aumento do gênero *Streptococcus* (11% e 78%).

Conforme demonstrado em praticamente todos os pontos de estudo, o gênero *Escherichia* permaneceu como o micro-organismo mais abundante (34% e 75%).



## 4.2 Perfil da microbiota fecal de acordo com a oferta de leite materno

As crianças analisadas foram separadas em dois grupos: as amamentadas exclusivamente com leite materno até o 5º mês de vida e as que receberam leite em pó ou artificial e/ou outro tipo de alimento, como iogurtes e papinhas, antes do 5º mês de vida.

As crianças de números 3, 12, 13, 14, 16 e 17 foram alimentadas exclusivamente com leite materno até o 5º mês de vida. A figura 5 mostra o perfil da microbiota fecal dessas crianças até o 1º ano de vida.

A microbiota deste grupo de crianças é composta predominantemente de *Escherichia* e bactérias do grupo não cultiváveis, apresentando oscilações ao longo dos meses, porém sem mudanças na frequência de colonização e, sim, quanto à abundância.

As crianças de números 3, 12, 16 e 17 foram tratadas com antibióticos orais ao longo deste primeiro ano de vida, devido a infecções do trato respiratório. Nota-se que a microbiota fecal no mês subsequente à administração do antibiótico é alterada, porém houve a tendência ao reestabelecimento nos meses seguintes.

Esse fato foi observado na criança 3 (gráfico 5A), que apresentou redução da colonização por *Escherichia* e aumento de *Klebsiella* no 1º mês de idade.

Na criança 12 (gráfico 5B), com 1 mês de idade, há predomínio de *Escherichia* e *Lactobacillus*, o qual não foi identificado no 3º mês, após a administração de antibiótico no 2º mês de idade, voltando a ser identificado no 6º mês. No 9º mês, a criança foi tratada novamente com antibiótico oral. Observa-se o predomínio de *Escherichia* mesmo após antibioticoterapia, que se mantém até o 1º ano de vida.

Nas crianças de números 13 e 14 (gráficos 5C e 5D, respectivamente) observa-se um pico de colonização por *Clostridium* no 1º mês de vida. Essa contaminação pode estar associada ao uso de chupeta, relatado pelas respectivas mães neste período.

A criança 16 (gráfico 5E) foi tratada com antibiótico no 6º mês, observa-se o declínio da colonização de *Escherichia* e predomínio de bactérias não cultiváveis e *Veillonella*.

A criança 17 (gráfico 5F) foi tratada com antibiótico oral no 6º mês de idade. Nos meses subsequentes observa-se uma tendência de aumento na colonização por *Clostridium* e *Streptococcus* e diminuição de *Escherichia* e de bactérias não cultiváveis.

As crianças de números 1, 2, 6 e 15 foram alimentadas com leite artificial, papinhas (com legumes e carne) e iogurtes antes do 5º mês de vida. O perfil da microbiota é mais diverso, diferente do observado no grupo anterior, sugerindo a interferência da alimentação no estabelecimento da microbiota nos primeiros meses de idade. Os dados referentes à microbiota fecal destas crianças estão dispostos na Figura 6.

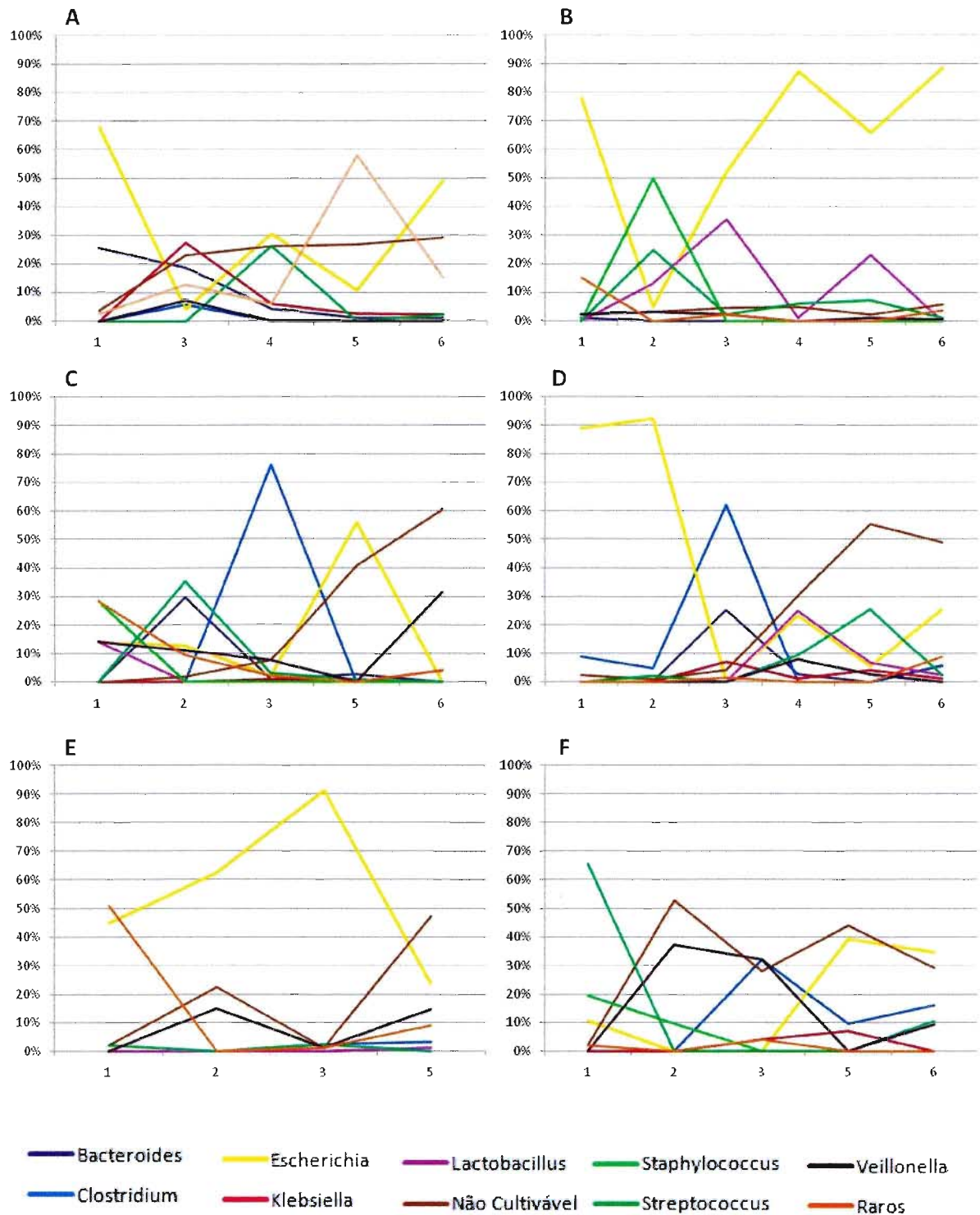
A criança de número 1 (gráfico 6A) teve a introdução de alimentação mista ao 2º mês de idade. No mês subsequente, ocorreu a redução da colonização do gênero *Escherichia* e o *Clostridium* se tornou o micro-organismo prevalente. No 9º mês, a criança foi tratada com antibiótico oral e observa-se a diminuição de *Lactobacillus*, com aumento de bactérias não cultiváveis, *Escherichia* e *Akkermancia*, gênero este que pertence ao grupo “raros”.

O gráfico 6B correspondente à criança nº 2. A microbiota desta criança apresenta o perfil bastante heterogêneo. Nos primeiros 3 meses de vida não foi

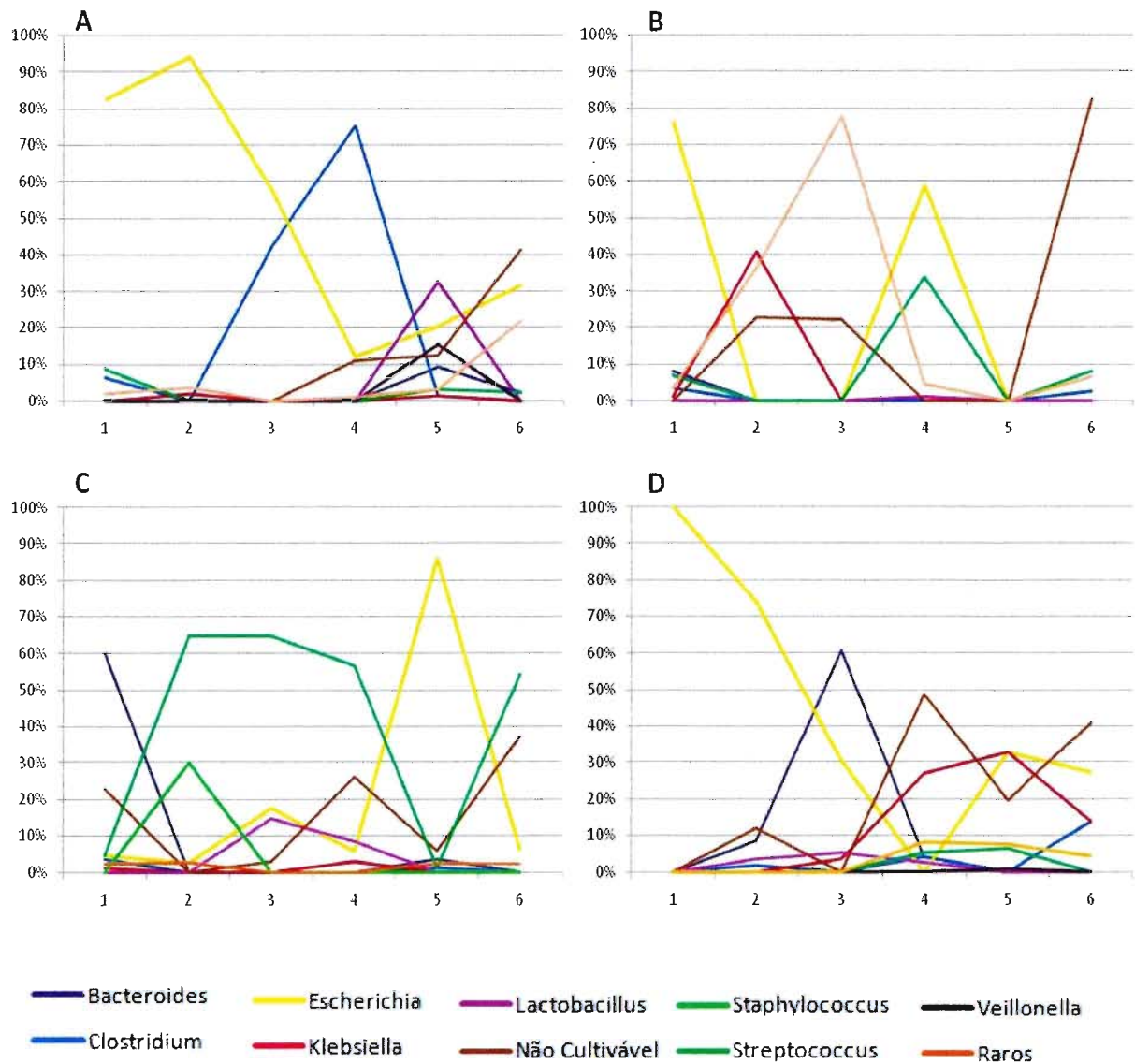
possível identificar as razões que justificassem esse perfil. Com a introdução de leite fluido com água na alimentação, no 3º mês de vida, observa-se o aumento no perfil de colonização do gênero *Escherichia*, o qual não foi identificado nos meses subsequentes, onde observa-se o predomínio de bactérias não cultiváveis.

O gráfico 6C corresponde à criança nº 6. Houve o predomínio de bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus* e *Streptococcus*, que permanecem como micro-organismo mais abundante no 1º mês de vida. No 4º mês foi introduzida alimentação sólida e a criança começou a frequentar uma creche. No 6º mês observa-se a redução quase por completa do gênero *Streptococcus*, que é substituído por *Escherichia*. Com 1 ano de vida observa-se baixo ganho de peso, a redução dos gêneros *Escherichia* e o aumento de *Streptococcus*, que é o gênero predominante neste período, seguido de bactérias não cultiváveis.

A criança de número 15 (gráfico 6D) apresenta um distúrbio neurológico grave e, conseqüentemente, foi hospitalizada 9 vezes ao longo do 1º ano. Sua microbiota fecal mostra-se bastante heretogênea, com predomínio de colonização do gênero *Escherichia*, seguido de *Bacteroides*, o qual se torna o gênero mais abundante no 1º mês de vida. No 4º mês ocorreu a introdução de alimentos sólidos e a criança foi hospitalizada pela primeira vez. Observa-se o predomínio de bactérias não cultiváveis, *Escherichia* e *Klebsiella*, até 1 ano de idade.



**Figura 5.** Perfil da microbiota fecal das crianças amamentadas com leite materno exclusivamente até o quinto mês de vida. A – Criança nº 3; B – Criança nº 12; C – Criança nº 13; D – Criança nº 14; E – Criança nº 16; F – Criança nº 17. Os seguintes pontos correspondem a: (1) dois dias; (2) sete dias; (3) um mês; (4) três meses; (5) seis meses; (6) um ano.



**Figura 6.** Perfil da microbiota fecal das crianças com alimentação mista antes do quinto mês de vida. A – Criança nº 1; B – Criança nº 2; C – Criança nº 6; D – Criança nº 15. Os seguintes pontos correspondem a: (1) dois dias; (2) sete dias; (3) um mês; (4) três meses; (5) seis meses; (6) um ano.

Com base nos resultados descritos acima, foram construídas tabelas com informações sobre a prevalência e a abundância dos principais gêneros bacterianos identificados neste estudo, em relação a cada ponto de análise. Este resultado também foi separado em dois grupos: crianças amamentadas com leite materno exclusivamente até o 5º mês de vida (Tabela 7) e crianças que receberam outro tipo de alimentação (alimentação mista) antes do 5º mês de vida (Tabela 8).

No grupo das crianças amamentadas exclusivamente com leite materno até o 5º mês de vida, observa-se a prevalência dos gêneros *Bacteroides*, *Veillonella* e *Lactobacillus* no 3º, 6º e 12º mês. No outro grupo, observa-se a prevalência de *Clostridium* e *Streptococcus*. Esses resultados evidenciam o efeito protetor do leite materno.

**Tabela 7.** Prevalência e abundância da microbiota fecal em crianças amamentadas com leite materno exclusivo até o 5º mês de idade

Bactérias	Pontos de análise					
	48 horas (n=6)	7 dias (n=5)	1 mês (n=6)	3 meses (n=3)	6 meses (n=6)	1 ano (n=5)
<i>Bacteroides</i>	+/-	+/-	1	2	+/-	1
<i>Clostridium</i>	+/-	+/-	2	0	+/-	1
<i>Escherichia</i>	3	2	1	3	2	2
<i>Klebsiella</i>	0	0	1	2	2	2
<i>Lactobacillus</i>	+/-	+/-	+/-	2	1	+/-
<i>Não Cultiváveis</i>	2	2	2	2	2	3
<i>Staphylococcus</i>	+/-	1	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	+/-	1	1	2	1	2
<i>Veillonella</i>	+/-	1	2	1	1	2

(n =) Número de crianças analisadas por ponto

0 Gênero não detectado

+/- Irregular (Presença em 1-39% das crianças)

1 Regular (Presença em 40-69% das crianças)

2 Constante (Presença em 70% ou mais das crianças)

3 Constante e abundante (Presença em 70% ou mais das crianças com no mínimo 30% de abundância)

**Tabela 8.** Prevalência e abundância da microbiota fecal em crianças com alimentação mista antes do 5º mês de vida

Bactérias	Pontos de análise					
	48 horas (n=4)	7 dias (n=4)	1 mês (n=4)	3 meses (n=4)	6 meses (n=3)	1 ano (n=4)
<i>Bacteroides</i>	1	+/-	+/-	+/-	2	+/-
<i>Clostridium</i>	2	+/-	+/-	1	2	1
<i>Escherichia</i>	3	2	2	2	2	2
<i>Klebsiella</i>	1	1	+/-	2	2	+/-
<i>Lactobacillus</i>	0	+/-	1	2	0	0
<i>Não Cultiváveis</i>	+/-	1	1	2	2	3
<i>Staphylococcus</i>	0	+/-	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	2	+/-	+/-	2	2	2
<i>Veillonella</i>	0	0	0	0	2	0

(n =) Número de crianças analisadas por ponto

0 Gênero não detectado

+/- Irregular (Presença em 1-39% das crianças)

1 Regular (Presença em 40-69% das crianças)

2 Constante (Presença em 70% ou mais das crianças)

3 Constante e abundante (Presença em 70% ou mais das crianças com no mínimo 30% de abundância)

### 4.3 Análises estatísticas

Foram analisados os índices de riqueza e de diversidade comparando os grupos dos 6 pontos de análise. Desta forma, as bibliotecas *16S rRNA* foram analisadas quanto aos índices descritos no item 3.6.5.

Após a exclusão das sequências de baixa qualidade e das sequências quiméricas, 3.990 clones foram identificados. Foram separadas 2.242 sequências no sentido de leitura 5'3' e estas sequências foram utilizadas nos testes riqueza e diversidade e análises estatísticas.

Foram calculados para cada ponto de análise os índices baseados em OTU, que permitem calcular a riqueza e a diversidade das amostras estudadas.

As taxas de cobertura das bibliotecas *16S rRNA* dos 6 pontos de análise apresentaram valores superiores a 90% para um cutoff de 0,05 (gênero). Embora as taxas de cobertura das bibliotecas tenham apresentado percentual elevado, apenas o grupo de 7 dias apresentou percentual de 99%, indicando que o esforço amostral foi suficiente para representar a diversidade da comunidade neste ponto. Os demais grupos apresentaram a necessidade de maior amostragem de clones para representar a real diversidade das amostras nestes pontos de análise (Tabelas 9 e 10).



**Tabela 9.** Índices de riqueza (Ace e Chao), de diversidade (Simpson e Shannon) e de cobertura, sob um cutoff de 95% (Gênero). Para os grupos de 2,7 e 30 dias

Amostra	Número de Sequências	OTUs	Riqueza		Diversidade		Cobertura (%)
			Ace	Chao1	Simpson	Shannon	
2 dias	421	36	84	56	0,150	2,391	96%
7 dias	304	27	28	28	0,113	2,566	99%
30 dias	352	38	45	41	0,078	2,918	97%

**Tabela 10.** Índices de riqueza (Ace e Chao), de diversidade (Simpson e Shannon) e de cobertura, sob um cutoff de 95% (Gênero). Para os grupos de 3, 6 e 12 meses.

Amostra	Número de Sequências	OTUs	Riqueza		Diversidade		Cobertura (%)
			Ace	Chao1	Simpson	Shannon	
3 meses	387	49	115	70	0,145	2,60	94%
6 meses	386	40	67	57	0,192	2,45	96%
12 meses	392	68	131	95	0,108	3,06	92%

As curvas de rarefação (Figura 7 e 8) ilustram o número de sequências obtidas e o número de OTU que estas sequências representam em nível de gênero (>95% de similaridade), e indicam se as sequências de DNA analisadas representam a riqueza real de micro-organismos de uma comunidade.

As curvas de rarefação dos grupos analisados demonstraram que o esforço amostral foi suficiente para cobrir a riqueza de gêneros somente no grupo de 7 dias; apenas este grupo apresentou um platô na curva de rarefação indicando que o esforço amostral foi suficiente para representar a real diversidade da comunidade (Figura 7).

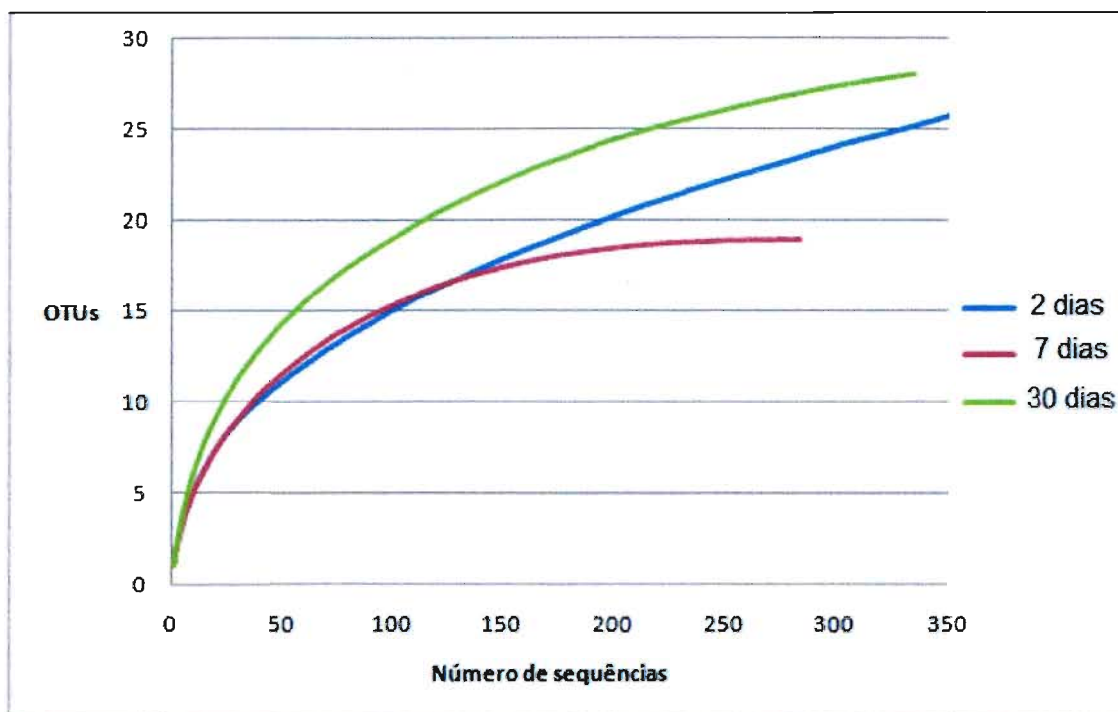


Figura 7. Curva de rarefação das bibliotecas 16S rRNA de 2, 7 e 30 dias.

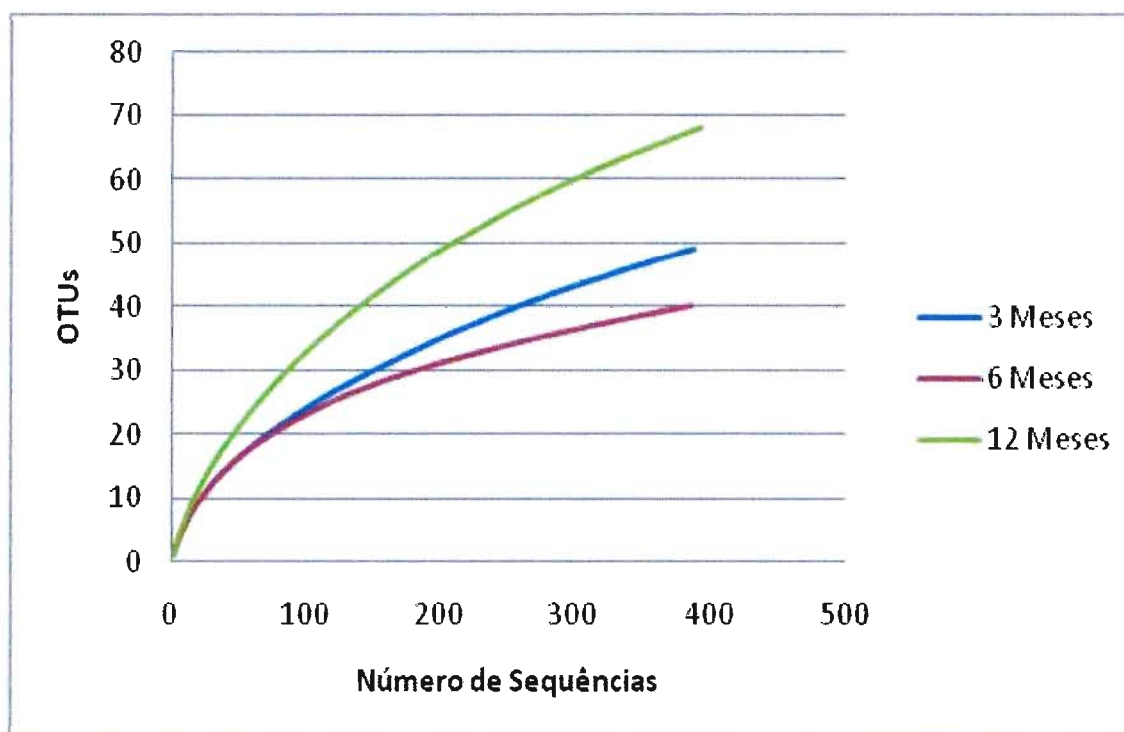


Figura 8. Curva de rarefação das bibliotecas 16S rRNA de 3, 6 e 12 meses.

A riqueza e a diversidade das amostras foram calculadas a partir de uma matriz de distância entre as sequências, construída no *software* Mothur.

Foi construída uma matriz de distância contendo os grupos de 2, 7 e 30 dias e outra matriz com os grupos de 3, 6 e 12 meses.

A riqueza observada pelos índices de Ace e Chao para as amostras de 2, 7 e 30 dias, mostraram que o grupo de 2 dias tem a maior riqueza de gêneros quando comparado com as amostras de 7 dias e 1 mês (Tabela 9). Os índices de riqueza (Ace e Chao) mostraram que o grupo de 12 meses apresentou maior riqueza quando comparado aos grupos de 3 meses e 6 meses. Interessantemente, o grupo de 6 meses apresentou menor riqueza que o grupo de 3 meses (Tabela 10). Estes dados confirmam os dados da curva de rarefação (Figura 8), no qual o grupo de 6 meses apresentou menor estimativa de riqueza. O grupo de 12 meses apresentou uma curva mais inclinada indicando maior riqueza de micro-organismos neste ponto de análise.

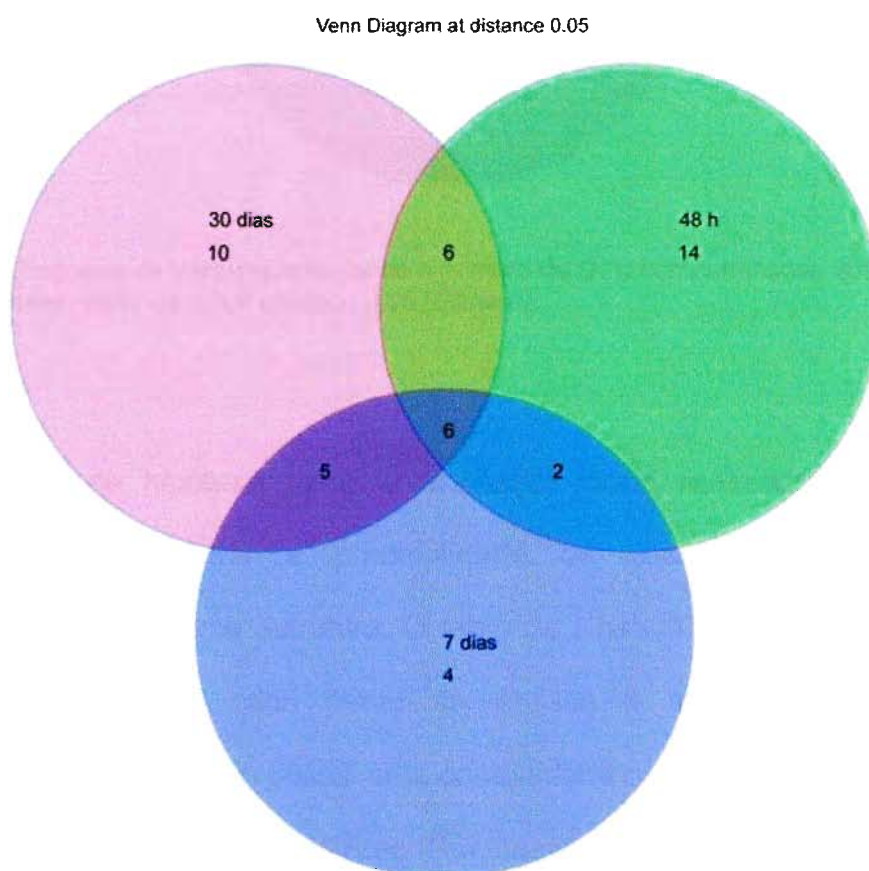
Curiosamente, diferente dos resultados obtidos com os índices de riqueza, os índices de diversidade de Simpson e Shannon, para as amostras de 2, 7 e 30 dias, mostraram menor diversidade no grupo de 2 dias e maior diversidade no grupo de 30 dias (Tabela 9).

Os índices de diversidade (Simpson e Shannon), para o grupo de 3 meses, 6 meses e 12 meses, mostraram menor diversidade no grupo de 6 meses, enquanto a maior diversidade foi observada no grupo de 12 meses (Tabela 10).

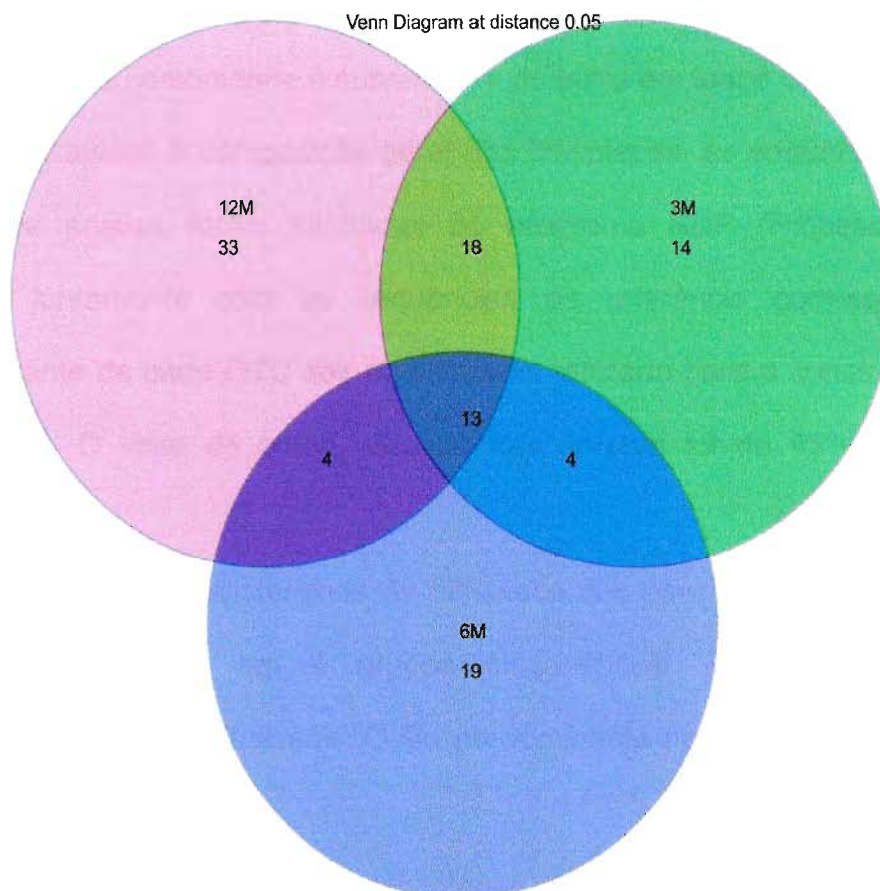
Para melhor representar os resultados de riqueza compartilhada entre as amostras, foram construídos diagramas de Venn, que representam, em uma análise detalhada, o número de OTU encontrada em cada ponto de análise e o número de OTU compartilhadas entre os grupos.

O grupo de 2 dias tem a maioria das sequências únicas (14 OTU) seguido por 30 dias (10 OTU) e 7 dias (4 OTU), sugerindo maior diversidade de micro-organismos nas primeiras horas de vida. No entanto, 6 OTU são compartilhadas entre os 3 pontos, sugerindo que estes micro-organismos permanecem até o 1º mês de nascimento (Figura 9).

O diagrama de Venn ilustrado na Figura 10 mostra que o grupo de 12 meses tem a maioria das sequências únicas (33 OTU), mostrando maior diversidade neste período, seguido pelo grupo de 6 meses (19 OTU) e 3 meses (14 OTU), 13 OTU são compartilhadas entre os 3 grupos.



**Figura 9.** Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de 2, 7 e 30 dias. Valor de cutoff utilizado 0,05 (Gênero).



**Figura 10.** Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de 3, 6 e 12 meses. Valor de cutoff utilizado 0,05 (Gênero).

Testes de hipótese (beta diversidade) foram realizados com os grupos estudados para mostrar a probabilidade de duas ou mais comunidades compartilharem a mesma estrutura. O teste de Libshuff revelou que a composição das comunidades de cada ponto de análise é significativamente diferente, mostrando que cada grupo possui uma comunidade com estrutura particular.

Com o uso do método UniFrac (Qualitativo e Quantitativo) foi possível avaliar, com base nas informações filogenéticas, que as comunidades estudadas de cada ponto de análise são diferentes. Com base na distância dos ramos da árvore filogenética, que contém informações de todos os grupos analisados, foi possível

determinar que as populações estudadas não compartilham a mesma comunidade, isto é, nenhuma comunidade é subamostra de outra em todos os grupos analisados.

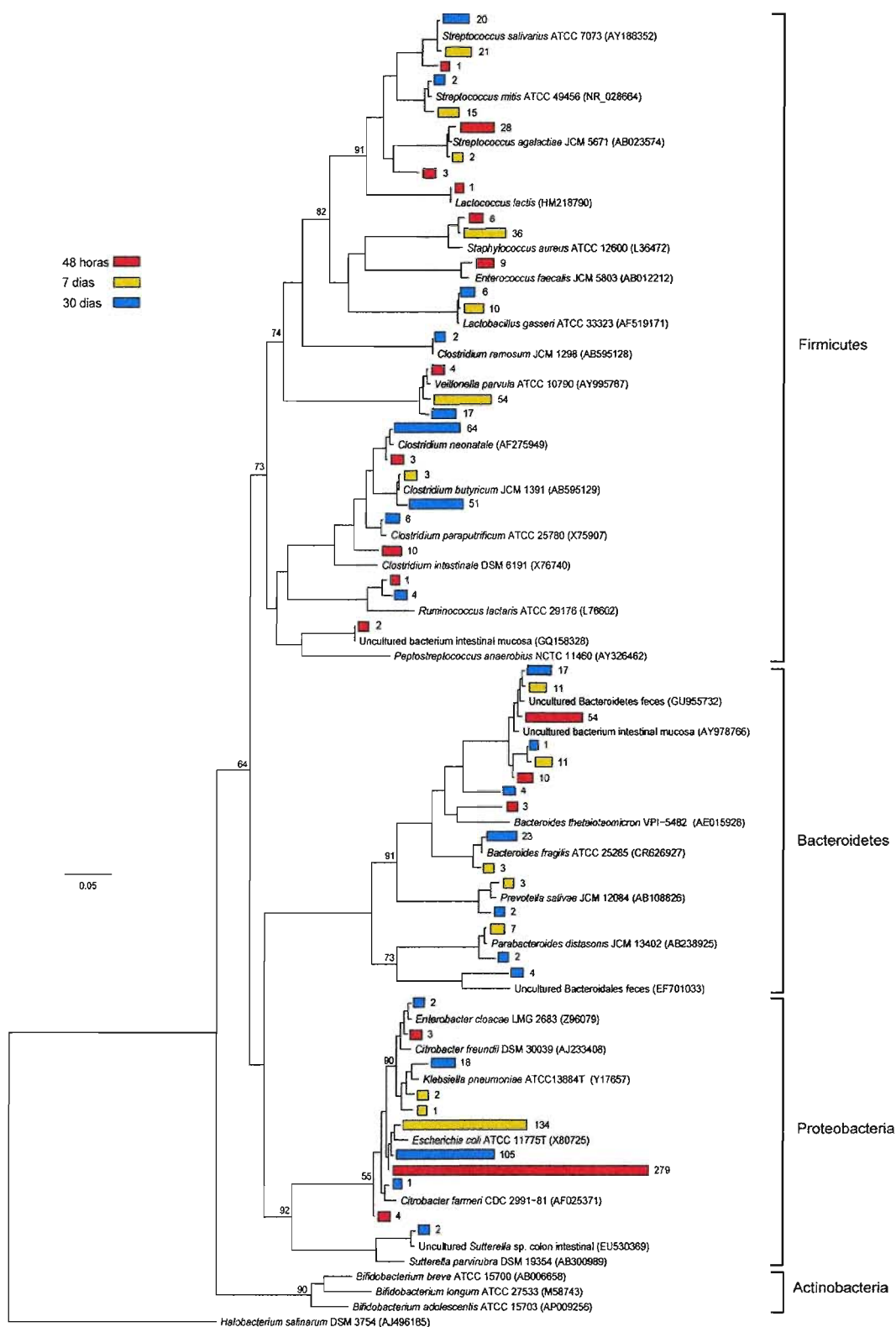
Para avaliar a composição geral das bibliotecas, as sequências de todos os pontos de análise foram alinhadas no programa RDP (Ribossomal Database Project), juntamente com as sequências de referência correspondentes. Um representante de cada OTU das amostras foi utilizado para a construção da árvore filogenética. O valor de cutoff utilizado nas árvores foi de 95% de similaridade (gênero).

As sequências bacterianas da biblioteca dos pontos de análise de 2, 7 e 30 dias estão divididas em 4 grupos filogenéticos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. O filo predominante nos 3 pontos de análise foi o filo *Firmicutes* (Figura 11).

A árvore filogenética das bibliotecas de 3 meses, 6 meses e 1 ano está dividida em 6 filotipos, sendo eles; *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Verrucomicrobia*. Podemos observar que a comunidade bacteriana neste grupo é dominada pelo filo *Proteobacteria*, porém, observamos que a riqueza de micro-organismos (número de OTU) é muito alta para o filo *Firmicutes*, mas a abundância relativa (número de clones dentro de cada OTU) é muito maior para o filo *Proteobacteria* (Figura 12).

A partir da análise das árvores filogenéticas é possível observar a filogenia dos clones identificados. Desta forma, podemos nos aproximar da identificação dos clones classificados como não cultiváveis. No grupo formado por crianças de 2 dias a 1 mês, 96% das bactérias não cultiváveis apresentaram similaridade com o filo *Bacteroidetes*, 2% *Firmicutes* e 2% *Proteobacteria*.

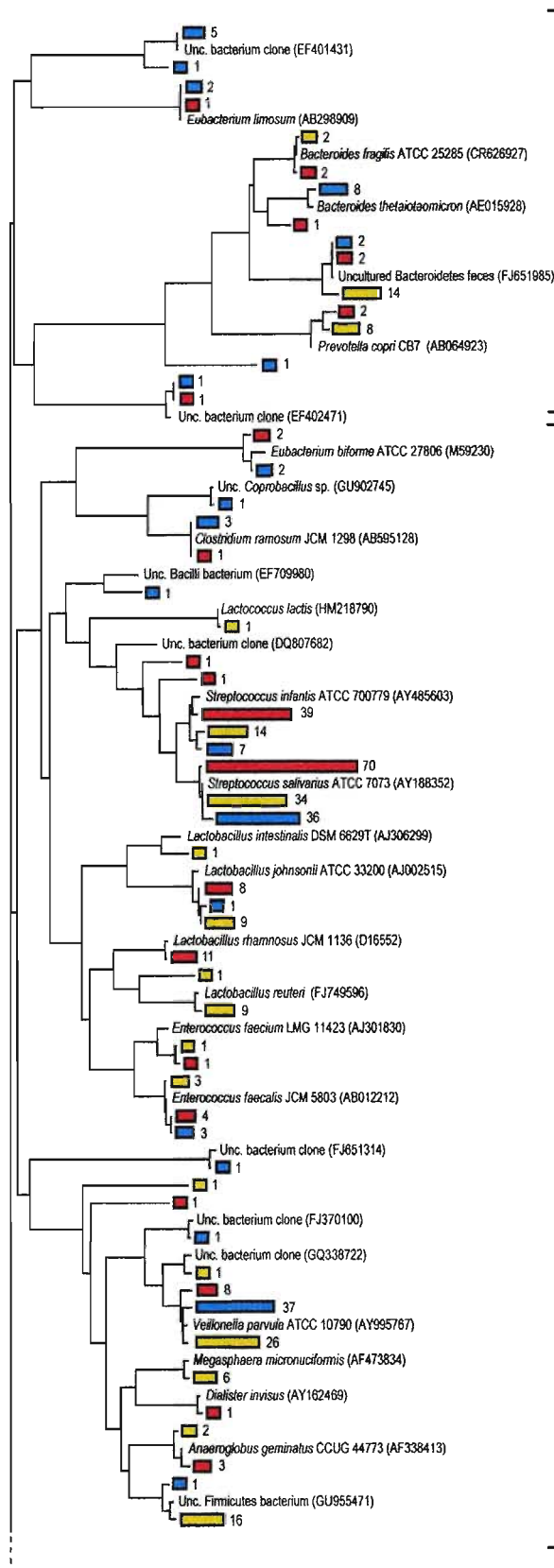
No grupo de crianças de 3 meses a 1 ano observamos que 82% dos clones não cultiváveis apresentaram similaridade com o filo *Firmicutes*, 14% de similaridade com o filo *Bacteroidetes* e 4% *Proteobacteria*.



**Figura 11.** Árvore filogenética das bibliotecas 16S rRNA dos 2º, 7º e 30º dias. Cada cor de barra representa um grupo e o número de clones relacionados a cada biblioteca. Sendo: vermelho (48 horas), amarelo (7 dias) e azul (30 dias). As sequências de referência (Tipo) são indicadas por nomes taxonômicos e os clones não cultiváveis são seguidos pelo número de acesso do GenBank entre parênteses.



3 meses ■  
 6 meses ■  
 12 meses ■



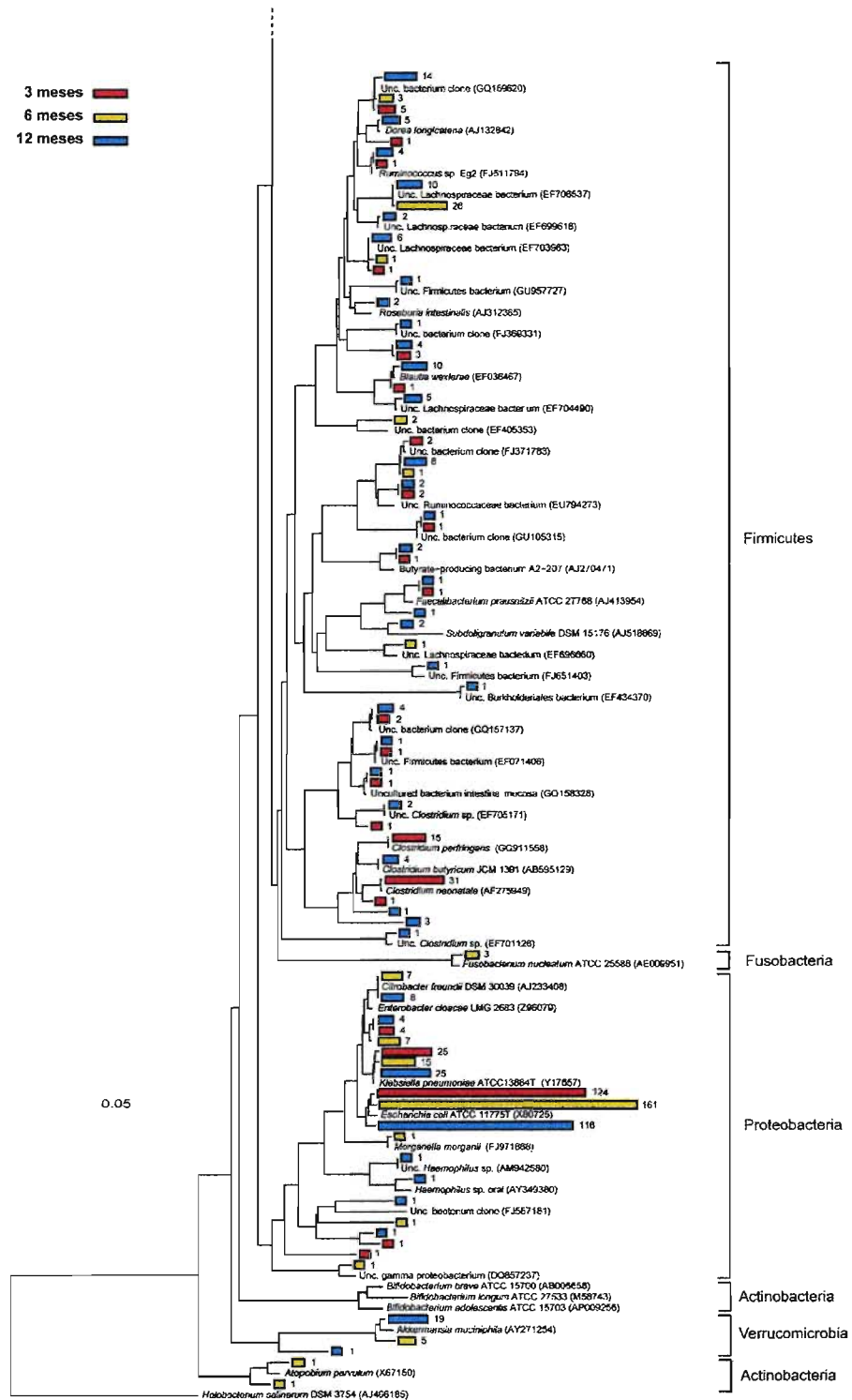
Bacteroidetes

Firmicutes

0.05

Continua

Continuação



**Figura 12.** Árvore filogenética das bibliotecas 16S rRNA dos 3º, 6º e 12º meses. Cada cor de barra representa um grupo e o número de clones relacionados a cada biblioteca. Sendo: vermelho (3 meses), amarelo (6 meses) e azul (12 meses). As seqüências de referência (Tipo) são indicadas por nomes taxonômicos e os clones não cultiváveis são seguidos pelo número de acesso do GenBank entre parênteses.

## 5. DISCUSSÃO

Sabe-se que o estabelecimento da população microbiana intestinal é um processo complexo, influenciado pela interação entre os micro-organismos e o hospedeiro, por fatores externos e internos (FANARO *et al.*, 2003).

A colonização do trato gastrintestinal infantil é um episódio marcante no ciclo de vida humano. Após o nascimento, um ecossistema rico e dinâmico se desenvolve a partir de um ambiente estéril. A evolução e a simbiose entre os primeiros micro-organismos a colonizarem a mucosa intestinal, até formar uma microbiota residente, sem dúvida, envolvem diversas interações recíprocas entre a microbiota e o hospedeiro, com importantes consequências para a saúde e a fisiologia humana (PALMER *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da microbiota intestinal é afetado pela região geográfica em que a criança nasce e esse fato é descrito até mesmo em países do mesmo continente. A formação da microbiota parece diferir entre crianças que vivem em países desenvolvidos e países em desenvolvimento, podendo, este fato, ser atribuído aos elevados níveis de contaminação ambiental que as crianças de países em desenvolvimento são expostas no início da vida (ADLERBERTH, 2009).

De acordo com a hipótese da higiene, práticas mais rigorosas de higiene adotadas em países desenvolvidos podem modificar a exposição microbiana inicial, e, conseqüentemente, o padrão da microbiota intestinal desses recém-nascidos, causando impacto negativo sobre a regulação imunológica, possivelmente levando à maior incidência de doenças alérgicas e autoimunes observadas nesses países (PENDERS *et al.*, 2006).

Os primeiros colonizadores intestinais são frequentemente organismos aeróbios facultativos como, por exemplo, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e enterobactérias. Posteriormente, os colonizadores tendem a ser anaeróbios estritos, como *Eubacterium* e *Clostridium* (PALMER *et al.*, 2007).

No ponto de análise 1 podemos observar o predomínio de colonização por bactérias anaeróbias facultativas, como os gêneros *Escherichia*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*, que apresentaram elevada frequência de colonização. Este resultado já era esperado, uma vez que o nível de oxigênio neste período ainda é muito alto, tornando o ambiente propício para a colonização destes microorganismos (ADLERBERTH *et al.*, 1999). No ponto de análise 1, as bactérias não cultiváveis foram encontradas em 60% das crianças analisadas e com abundância relativa de 4%.

A análise da microbiota fecal por técnicas de cultura independente tem revelado novas descobertas, uma vez que apenas 20 a 30% dos gêneros bacterianos componentes da microbiota são cultiváveis, podendo ser isolados e identificados. Com a construção de bibliotecas 16S *rRNA*, uma quantidade importante de bactérias nunca antes isoladas tem sido detectada, porém, não há registros prévios de sua composição genômica. Esse fato impossibilita a identificação de todos os clones obtidos na construção de bibliotecas, quando comparamos suas sequências do gene 16S com o banco de dados global. Esses clones são, então, chamados de bactérias não cultiváveis ou bactérias não identificadas (SCHIFFRIN e BLUM, 2002).

A identificação destes clones pode ser realizada com o sequenciamento total de seu genoma ou, então, a identificação de filo e/ou gênero pode ser sugerida com

a construção de árvores filogenéticas procurando identificar a similaridade destes clones desconhecidos com gêneros bacterianos já identificados.

Os números de frequência de colonização analisados mostram elevada colonização pelos gêneros *Escherichia*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* nos períodos de 2 e 7 dias de vida (pontos de análise 1 e 2). Estes valores estão certamente relacionados à contaminação interpessoal e ambiental, além das precárias condições de moradia e saneamento, às quais as crianças estudadas são expostas já nos primeiros meses de vida. Todas as crianças incluídas neste estudo são moradoras da favela São Remo, localizada nas proximidades do Hospital Universitário da USP, e são sujeitas a precárias condições de saneamento e higiene.

Altas taxas de colonização pelo gênero *Escherichia*, principalmente nos primeiros meses de vida, foram descritas praticamente de forma unânime pelos primeiros estudos que analisaram a instalação da microbiota em recém-nascidos, tendo sido observados em diferentes países do mundo (MATA,1972; SIMHON, 1982; YOSHIOKA,1983).

Em países em desenvolvimento, a exposição acentuada a bactérias do ambiente pode induzir um padrão de colonização instável e favorecer a presença de bactérias potencialmente patogênicas em números relevantes. Em um estudo realizado com crianças da Guatemala, enterobactérias e *Streptococcus* puderam ser identificados em amostras de mecônio nas primeiras 7h de vida. Nessas sociedades a amamentação materna exclusiva é importante para desenvolver uma microbiota com baixo potencial patogênico (FANARO, 2003).

Em um estudo realizado com crianças do Paquistão, verificou-se elevada colonização por enterobactérias nos primeiros meses de vida. Bactérias identificadas no ambiente foram consideradas como principal fonte de contaminação. Apesar de

todas as crianças terem nascido em casa, de parto natural, menos de 50% das linhagens do gênero *Escherichia* eram correspondentes a linhagens maternas, sendo que a maioria das cepas identificadas foi semelhante às identificadas no ambiente familiar (ADLERBERTH, 1998).

Em um estudo realizado na Suécia Lindberg *et al.* (2003) evidenciaram a alta colonização por *Staphylococcus* nas fezes de recém-nascidos. Neste estudo a fonte desta contaminação foi investigada em 50 famílias, as cepas foram isoladas das mãos, narinas e mamilos, maternos, e das mãos e narinas paternas. O autor concluiu que a colonização intestinal por *Staphylococcus* na fase inicial esteve fortemente associada à transmissão pela pele dos pais. Estes resultados sugerem que esses micro-organismos se estabelecem facilmente no intestino infantil, talvez devido à falta de concorrência de uma microbiota intestinal estabelecida.

A detecção de *Staphylococcus* e *Streptococcus* no segundo dia de vida sugere que a possível transferência deste micro-organismo seja derivada inicialmente da microbiota vaginal materna, que posteriormente foram substituídas por bactérias provenientes da pele dos pais e do ambiente (ADLERBERTH *et al.*, 2008).

No ponto de análise 3, correspondente ao 1º mês de vida, houve aumento na diversidade bacteriana, principalmente entre as bactérias anaeróbias, evidenciando o fato da microbiota predominantemente aeróbia do recém-nascido transformar-se em predominantemente anaeróbia após a segunda semana de vida, (ADLERBERTH *et al.*, 1999), mostrada pela redução nas taxas de colonização por micro-organismos anaeróbios facultativos e aumento da frequência de colonização por micro-organismos anaeróbios estritos, como *Bacteroides* e *Clostridium*.

Entre os táxons anaeróbios identificados, ocorreu o predomínio do gênero *Clostridium* nas amostras de 1 mês de vida. Este alto padrão de colonização pode ser atribuído à contaminação ambiental. Em revisão de Brazier JS (2005), foi descrita a capacidade do *Clostridium difficile* de colonizar superfícies comuns no meio ambiente, como água, solo, animais e utensílios domésticos. Interessantemente, nas crianças 13 e 14, após início do uso de chupeta, foi observado o predomínio de clones do gênero *Clostridium*, indicando possível contaminação ambiental, uma vez que a chupeta pode ter sido um veículo de contaminação.

Adlerberth *et al.* (2008) mostraram que o gênero *Clostridium* pode atingir uma população relativamente alta no intestino sem causar sintomas em crianças até um ano de vida. Porém, no final do primeiro ano, com a microbiota mais complexa, este gênero torna-se menos frequente. Além disso, o gênero *Clostridium* é mais prevalente nas crianças alimentadas com leite de fórmula do que nas que são amamentadas exclusivamente com leite materno, enquanto que *Staphylococcus* tendem a ser mais abundantes em crianças amamentadas (ADLERBERTH *et al.*, 2008). Estes dados concordam com os nossos resultados no qual gênero *Clostridium* foi identificado com menor abundância no primeiro ano de vida e em crianças amamentadas exclusivamente até o quinto mês pós-nascimento.

Aos 6 e 12 meses, observa-se maior colonização por bactérias não cultiváveis, isto é, bactérias ainda não identificadas por métodos de cultura convencionais e por gêneros bacterianos pouco frequentes, agrupados como "raros", como, por exemplo, *Eubacterium*, *Megasphaera* e *Akkermansia*. Esses achados caracterizam o crescimento na diversidade da microbiota nesses pontos de

análise. Este dado provavelmente se deve ao fato de as crianças terem maior contato com contaminações ambientais, como creches e berçários.

Além disso, *Escherichia* foi o gênero predominante nos pontos de tempos estudados. Esses resultados estão de acordo com os achados na literatura, no qual este gênero bacteriano é o predominante em crianças nascidas de parto natural em países em desenvolvimento (EDWARDS *et al.*, 2002; FANARO *et al.*, 2003).

Bactérias não cultiváveis apresentaram importante e gradual aumento na porcentagem de abundância ao longo do primeiro ano de idade, sendo as responsáveis por cerca de 40% da colonização das crianças no 1º ano de idade, evidenciando a complexidade da composição da microbiota fecal neste período da vida da criança. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, pode-se sugerir que o estabelecimento desta complexidade no primeiro ano de vida determine a composição de sua microbiota na idade adulta.

Segundo Palmer *et al.* (2007), a microbiota de crianças com um ano de vida é diferente das crianças mais novas e muito similar a dos adultos. Além disso, observou-se que as populações são desiguais e são fortemente dominadas por um único grupo taxonômico. Outra característica notável no desenvolvimento temporal da microbiota de muitos dos lactentes foi a ocorrência de uma ou mais mudanças na estrutura da população; tais mudanças eram frequentemente estabilizadas dentro de um intervalo de amostragem. Progressivas mudanças ocorrem no ambiente intestinal, devido ao desenvolvimento intrínseco e às alterações que ocorrem na mucosa intestinal no período de transição para um adulto, além da dieta, e dos efeitos da própria microbiota. O mesmo perfil foi observado no nosso estudo, em que a partir do 6º mês observa-se a alta dominância dos gêneros *Escherichia* e de



bactérias não cultiváveis compondo a microbiota fecal, além da grande variação na estrutura da população de micro-organismos identificados nas crianças estudadas.

Observamos que as taxas de colonização pelo gênero *Bacteroides* variavam muito de criança para criança, porém estavam sempre presentes, mesmo em pequenas proporções, em quase todos os lactentes até um ano de vida. Vários outros táxons, incluindo *Veillonella* e *Clostridium*, tendem a colonizar apenas transitoriamente. Estes dados estão de acordo com o estudo de Palmer *et al.* (2007) em que um grupo de 14 lactentes saudáveis foi estudado utilizando-se a técnica de *microarray* e biblioteca *16S rRNA*. No decorrer do primeiro ano de vida deste grupo de crianças foi observada grande variação no perfil de colonização dos gêneros *Prevotella*, *Acinetobacter*, *Desulfovibrio*, *Veillonella* e *Clostridium*.

Entre as bactérias anaeróbias encontradas no intestino temos, principalmente, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* (FINEGOLD, 1977). Depois de instalada a microbiota intestinal, por volta dos 18 aos 24 meses, as bactérias anaeróbias representam 97% da sua composição, sendo considerada saudável a microbiota que apresente grande participação dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (MORAIS e JACOB, 2006).

Os lactobacilos e as bifidobactérias auxiliam na manutenção de um balanço saudável da microbiota intestinal, por produzirem compostos orgânicos decorrentes da atividade fermentativa que inibem a multiplicação de bactérias com potencial de dano ao epitélio intestinal. São, também, capazes de contribuir para a redução da alergenicidade das proteínas, minimizando o risco de alergia alimentar, além de estimular a produção de muco, contribuindo para a eficácia do papel de barreira da mucosa intestinal (MORAIS e JACOB, 2006).

É importante destacar que em nossos resultados não houve a detecção do gênero *Bifidobacterium* e houve baixa detecção de micro-organismos dos gêneros *Enterococcus*, *Eubacterium* e *Lactococcus*. Uma das possíveis explicações para a não detecção de *Bifidobacterium sp*, um dos principais anaeróbios encontrados no trato gastrointestinal, seria a ocorrência de falha metodológica, uma vez que o DNA deste gênero bacteriano possui grandes porcentagens de C+G e a desnaturação e o pareamento dos iniciadores na reação de PCR são prejudicados, falhando, desta forma, a amplificação do gene 16S de bifidobactérias (MATSUKI *et al*, 2004).

A análise das sequências dos iniciadores considerados universais para bactérias mostra que há pelo menos três regiões de falha de anelamento com o gene 16S *rRNA*. Essa pode ser uma segunda explicação para a falha em detectar *Bifidobacterium sp*. Estudos anteriores mostram a dificuldade de identificação de alguns gêneros bacterianos pela técnica de PCR clássico, como, por exemplo, *Bifidobacterium sp* (MATHYS *et al.*, 2008).

Estudos preliminares com o banco de amostras de fezes do nosso laboratório, utilizando a técnica de qPCR, detectaram a presença de bifidobactérias nas amostras testadas. A quantificação revelou contagem média de  $10^9$  UFC/g de fezes, confirmando que este micro-organismo está de fato presente nas amostras fecais deste grupo de crianças estudadas.

Os *Lactobacillus* mantiveram-se presentes em todos os pontos de análise, variando sua frequência entre as crianças, evidenciando o fato de que o leite materno é uma importante fonte natural deste gênero bacteriano. Isto pode ser observado nas crianças que foram amamentadas exclusivamente até os 5 primeiros meses de idade.

Para determinar as diferenças no perfil de colonização dos grupos de crianças que foram e as que não foram amamentadas exclusivamente com leite materno até o 5º mês de idade, foram coletados os dados relacionados à composição da microbiota com as intercorrências clínicas, mudanças de hábitos familiares e domésticos, tipo de amamentação, mudanças alimentares e uso de medicamentos.

Podemos observar que as crianças que tiveram uma alimentação mista possuem maior diversidade da microbiota fecal, comparadas ao grupo de crianças amamentadas exclusivamente com leite materno, como é possível observar na Figura 6. Além disso, podemos observar que as populações são desiguais, cada criança tem um padrão único e variável de colonização; esse fato se explica pelas condições diversas em que cada uma foi exposta no decorrer dos meses.

O uso de antibiótico pode afetar o padrão de colonização do TGI na criança. Os agentes antimicrobianos têm efeitos específicos em componentes individuais da microbiota, ao invés de uma supressão geral e não específica e o perfil microbiano resultante influencia a população que emerge após o término do tratamento (LUNDEQUIST *et al.*, 1985).

No estudo de Sakata *et al.*(1986), os autores analisaram o comportamento da microbiota fecal de 54 crianças após o uso de antibióticos e observaram que todos os antibióticos alteram quantitativa e qualitativamente o perfil da microbiota fecal. O referido trabalho mostra que o padrão característico observado foi de considerável supressão de *Bifidobacterias*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Foi observada ainda a redução significativa do gênero *Escherichia* e aumento no padrão de colonização de *Klebsiella*.

Esses achados foram observados em algumas crianças, como, por exemplo, a criança número 3, a qual fez uso de antibiótico oral para o tratamento de impetigo.

Interessantemente, observamos a queda importante da frequência de *Escherichia* e o aumento de *Klebsiella*. O mesmo é observado com o perfil da microbiota fecal da criança número 12, em que, antes da administração de antibióticos, a microbiota era predominantemente composta por *Escherichia* e *Lactobacillus* e após a administração de antibióticos para o tratamento de otite, no 2º mês de vida, o gênero *Lactobacillus* foi suprimido sendo reestabelecido no perfil da microbiota do 6º mês de idade.

As crianças amamentadas com leite materno têm mais bifidobactérias e estafilococos na microbiota intestinal, em relação às que tomam mamadeira, que têm maior número de *Enterococcus* e *Clostridium*. O leite materno contém fator bífido, o qual favorece o crescimento de bactérias probióticas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (ADLERBERTH *et al.*, 2008).

A baixa capacidade tamponante do leite humano permite também a melhor atuação das bactérias produtoras de ácido láctico pela redução do pH intestinal desfavorável ao crescimento de vários micro-organismos patogênicos. As crianças amamentadas com leite materno, quando comparadas com as alimentadas artificialmente, são menos colonizadas por bactérias com potencial patogênico, como *Clostridium* (EDWARDS e PARRET, 2002).

Em um estudo realizado com crianças no Paquistão, o aleitamento materno a partir do primeiro dia de vida causou a redução efetiva na colonização por *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Clostridium*. O aleitamento materno pode induzir a presença de bactérias comensais e, portanto, poderia reduzir a presença de micro-organismos hostis (FANARO, 2003). Estes dados concordam com os nossos, uma vez que observamos a redução significativa do gênero *Clostridium* nas amostras

das crianças amamentadas com leite materno exclusivamente, como é o caso das crianças 13 e 14, ilustrado na Figura 5.

A riqueza e a diversidade das amostras estudadas foram avaliadas para os 6 pontos de análise e as taxas de cobertura foram satisfatórias, pois apresentaram valores superiores a 90% para um *cutoff* de 0,05 (Gênero).

Embora as taxas de cobertura das bibliotecas tenham apresentado percentual elevado, somente o grupo de 7 dias apresentou 99% de cobertura, representando a diversidade da comunidade bacteriana neste ponto; os demais grupos necessitam de mais clones para representarem a real diversidade da comunidade.

Esses dados concordam com os observados nas curvas de rarefação, no qual somente a curva do grupo de 7 dias atingiu um platô, sugerindo que a estimativa de riqueza deste ponto foi contemplada. No entanto, a inclinação da curva de 7 dias foi menor do que para as curvas de 2 e 30 dias, sugerindo menor riqueza no 7º dia de vida.

A curva de rarefação da amostra de 6 meses apresentou menor estimativa de riqueza quando comparada com as sequências de 3 meses e de 1 ano. O grupo de 1 ano apresentou claramente uma curva de rarefação mais inclinada, sugerindo maior riqueza taxonômica no 1º ano de vida. Portanto, ainda é necessária a análise de mais sequências para que a curva de rarefação dos demais grupos atinja um platô representando a real riqueza das amostras.

Assim como ocorreu na estimativa da curva de rarefação representada por uma curva mais inclinada, os índices de Ace e Chao apresentaram maiores índices de riqueza na amostra de 2 dias, comparado com o grupo de 7 e 30 dias.

Durante e após o nascimento, as crianças são expostas a grandes quantidades de bactérias que se originam da mãe e do ambiente entorno. O 2º dia de vida representa o primeiro contato com estes micro-organismos, que são os pioneiros e irão criar condições para a colonização de outros que eventualmente formarão a microbiota intestinal. Os índices de riqueza do 2º dia de vida mostram o perfil inicial de colonização que posteriormente foi modificado.

A análise estatística comparando a composição da microbiota do grupo de crianças que foram alimentadas exclusivamente com leite materno, com a microbiota do grupo de crianças que receberam alimentação mista e/ou alimentos sólidos, não foi possível devido às diferenças interpessoais da composição da microbiota de cada indivíduo. Desta forma, não foi possível determinar estatisticamente a influência da alimentação na composição da microbiota ao longo do primeiro ano de vida.

A diferença estatística do grupo que foi tratado com antibióticos não foi analisada, o baixo número amostral de crianças que fizeram uso desta medicação não permitiu aplicar os índices estatísticos com precisão.

Curiosamente, os índices de Simpson e Shannon mostraram menor diversidade para o grupo de 2 dias. Estes resultados sugerem que o intestino dos recém-nascidos possui grande variedade de micro-organismos em sua estrutura, porém algumas populações se tornam dominantes. De fato, no segundo dia de vida houve elevada colonização pelo gênero *Escherichia*, sendo este responsável pela alta dominância na colonização neste período.

O grupo de 6 meses apresentou baixos índices de riqueza e diversidade. A baixa riqueza e diversidade observada para o grupo de 6 meses pode ser reflexo do domínio de um único grupo taxonômico nesta comunidade. Neste ponto de análise o gênero *Escherichia* é o mais abundante, representando 40% da microbiota. Além

disso, o 6º mês é um período de adaptação e reorganização da microbiota, provocado por mudanças nos hábitos alimentares das crianças.

Concordando com a análise da curva de rarefação, os índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) mostraram que o grupo de 12 meses é mais homogêneo, não possui um gênero dominante, tem a maior riqueza e diversidade de micro-organismos, comprovando o aumento da complexidade da microbiota fecal no primeiro ano de vida.

Os índices de riqueza e diversidade não foram constantes, considerando o desenvolvimento da comunidade ao longo do tempo. Essas variações sugerem que a sucessão dos micro-organismos ao longo do desenvolvimento da microbiota seja um processo dinâmico, envolvendo a entrada e a substituição de alguns micro-organismos ao longo do tempo.

As árvores filogenéticas construídas com as bibliotecas de todos os pontos de análise mostraram o mesmo perfil de colonização e de abundância de gêneros apresentados pelos gráficos de abundância relativa.

A comunidade bacteriana fecal identificada nas crianças de 2, 7 e 30 dias, mostrou ser heterogênea quanto à estrutura amostral, porém, apresentando domínio do filo *Firmicutes*, principalmente de bactérias Gram-positivas. Porém, quando avaliamos a abundância relativa dos gêneros encontrados, o número de clones correspondentes à *Escherichia* é alto e, conseqüentemente, há homogeneidade quanto à distribuição de bactérias Gram-positivas e negativas, contrariando dados de microbiota de adultos em países desenvolvidos, os quais mostram o predomínio de bactérias Gram-positivas compondo a microbiota fecal (ZOETENDAL, 2008).

A análise filogenética do grupo de crianças de 3 meses, 6 meses e 1 ano gerou uma árvore de distância com 6 grupos; dentre eles, o filo que representou a

maior abundância de gêneros foi o *Proteobacteria*, que constituiu a maioria das sequências identificadas. Dentro deste filo os gêneros mais abundantes foram *Escherichia* e *Klebsiella*. O filo *Firmicutes* apresentou maior riqueza, com a maioria das sequências únicas, mas não representando o filo dominante.

A análise filogenética dos clones pertencentes ao grupo dos não cultiváveis mostra que este grupo é predominantemente composto por membros do filo *Bacteroidetes* até o primeiro mês de vida. Ao longo do primeiro ano, os micro-organismos não cultiváveis apresentaram maior riqueza e diversidade e são predominantemente compostos por bactérias do filo *Firmicutes*, mostrando a evolução da complexidade da microbiota fecal.

A microbiota intestinal possui características individuais, porém alguns filotipos são compartilhados entre os indivíduos. Os seres humanos também partilham de um núcleo comum de micro-organismos. Deste modo, a composição da microbiota intestinal é diversificada, porém é dominada por espécies bacterianas limitadas (ZOETENDAL, 2008).

O diagrama de Venn, construído com as amostras de 2, 7 e 30 dias, mostrou que o grupo de 2 dias tem a maioria das sequências únicas, com 14 OTU. No período logo após o nascimento, as crianças são expostas à grande quantidade de micro-organismos. No entanto, esse perfil muda ao longo do 1º mês de vida, sugerindo que a carga bacteriana à qual o recém-nascido é exposto parece ser transitória.

Seis OTU são compartilhadas entre as amostras de 2, 7 e 30 dias e estas OTU pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Escherichia* e dois gêneros de bactérias não cultiváveis isoladas de fezes e da mucosa intestinal que pertencem ao filo *Bacteroidetes*.



O resultado do diagrama de Venn indica que 13 OTU, que pertencem aos gêneros *Escherichia*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Veillonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* e ao filo *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacterium*, foram compartilhadas entre os grupos de 3 meses, 6 meses e 1 ano, sugerindo que estes micro-organismos tenham papel importante no desenvolvimento da microbiota. Com esta análise observa-se claramente o aumento da riqueza da microbiota ao longo dos meses, de acordo com o número de OTU que pertencem a cada ponto de análise. O grupo de 1 ano possui a maior quantidade de OTU única, seguido pelo grupo de 6 meses e, com menor número, pelo grupo de 3 meses.

A microbiota intestinal desempenha importantes funções para saúde do ser humano, no entanto as bactérias intestinais representam um microbioma complexo e incompreendido. O uso de técnicas moleculares para o estudo da microbiota fecal tem contribuído para a aplicação de métodos rápidos e independentes de cultivo e tem revelado grande diversidade da microbiota nas amostras analisadas. No entanto, pode-se argumentar que a informação obtida a partir da análise da microbiota das fezes não fornece resultados precisos sobre a microbiota de mucosa intestinal. Porém, alguns estudos demonstraram que a microbiota fecal reflete na microbiota do colón intestinal (TANNOCK, 2005)

A definição exata da microbiota da mucosa intestinal ainda é muito difícil porque os procedimentos de coleta são invasivos e as consequências deste procedimento são desconhecidas. Além disso, as amostras colhidas por biópsias do cólon intestinal não estão livres de contaminação, pois o fluido fecal continua presente na superfície do intestino. Portanto, não está claro o que exatamente está

sendo descrito nos estudos atuais, se é a composição de mucosa ou contaminação da comunidade fecal (TANNOCK, 2005).

O estabelecimento da microbiota intestinal é influenciado por muitos fatores, incluindo dieta, etnia, saneamento, higiene, geografia e clima. A composição da microbiota fecal das crianças analisadas neste estudo é semelhante ao perfil identificado em crianças de países em desenvolvimento e parece diferir das crianças de países desenvolvidos. A elevada quantidade de enterobactérias identificadas ao longo do 1º ano de vida deste grupo de crianças também foi observada em outros estudos realizados em recém-nascidos saudáveis de países em desenvolvimento, como nos trabalhos de Adlerberth (1991) e Fanaro (2003). No entanto, nos últimos anos, alguns autores têm afirmado que este predomínio de enterobactérias teria diminuído significativamente em recém-nascidos de países desenvolvidos (VAEL e DESAGER, 2009; ADLERBERTH, 2006). Estas modificações podem estar ocorrendo em função do desenvolvimento de melhores práticas de higiene, alterando a diversidade e a abundância de micro-organismos a que estes recém-nascidos são expostos (ADLERBERTH, 2006).

A disparidade dos resultados de diferentes estudos ilustra a dificuldade para definir a composição da microbiota intestinal. No entanto, essas abordagens têm indicado que a microbiota é individual e local específica, além disso, sua diversidade é muito grande, com muitas novas espécies bacterianas a ser pesquisadas (ZOETENDAL, 2008).

Estudos realizados com as técnicas de clonagem e sequenciamento têm sido usados para caracterizar a microbiota de fezes humana. A construção de biblioteca de *16S rRNA* vem demonstrando ser uma ótima técnica molecular para evidenciar a composição da microbiota intestinal. Porém, muitos problemas surgem quando esta

técnica é aplicada, como alto custo e viés dos iniciadores e das clonagens. Alguns estudos com metodologias diferentes de identificação da microbiota fecal estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório. As amostras fecais deste grupo de crianças estão sendo analisadas utilizando-se a metodologia de DGGE e PCR em tempo real, a fim de preencher as possíveis falhas metodológicas, sendo possível conhecer a real diversidade da microbiota fecal deste grupo de crianças ao longo do primeiro ano de vida.

Os resultados obtidos neste estudo, em conjunto com os demais realizados pelo nosso grupo de pesquisa, trazem contribuições relevantes acerca da evolução do estabelecimento da microbiota fecal de um grupo de crianças saudáveis no Brasil.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que:

- A abordagem molecular utilizada neste estudo permitiu a análise da microbiota fecal de um grupo de crianças de São Paulo, Brasil.
- O perfil da microbiota deste grupo de crianças é diferente do que é descrito nos países desenvolvidos.
- Cada indivíduo possui uma microbiota particular.
- A riqueza e a diversidade da microbiota fecal aumentam conforme a idade.
- A microbiota fecal deste grupo de crianças é composta predominantemente pelos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*.
- A metodologia utilizada não foi adequada para a identificação do gênero *Bifidobacterium*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERBERTH I, JALIL F, CARLSSON B, et al. High turnover rate of *Escherichia coli* strains in the intestinal flora of infants in Pakistan. *Epidemiol Infect.*; 121:587-98, 1998.

ADLERBERTH I., WOLD AE. - Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica*; p. 229-238, 2008.

ADLERBERTH, I. - Establishment of normal intestinal microflora in the newborn infant. In: Hanson LA, Yolken RH, editors. Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora. *Nestlé Nutrition Workshop Series*, vol. 42. , Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; p. 63-78, 1999.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. - Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology. 4th ed, 1999.

BERDANI, R.; ROSSI, E.A.; Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de colón . Departamento de alimentos e nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual paulista, Araraquara, São Paulo Brasil.

BLAUT, M.; COLLINS, M.D.; WELLING, G.W.; DORÉ, J.; VAN LOO, J. E. de Vos W. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *British Journal of Nutrition*; 87(2): S203-S211, 2002.

BRAZIER JS.; OZAKI E.; SHOZU M.; INOUE .; 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*; (1):43-8, 2005.

CHRISTINE F. FAVIER, et al. Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 219–226, 2002.

DERRIEN, M.; COLLADO, M.C.; KAOUTHER, B.A.; SALMINEN, S.; VOS, W.M. The Mucin Degradator *Akkermansia muciniphila* Is an Abundant Resident of the Human Intestinal Tract. *Applied and environmental microbiology*, p.1646–1648, 2008.

EDWARDS, C.A.; Parret, A.M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr*, 88(1): S11-S18, 2002.

FANARO, S.; CHIERICI, R.; GUERRINI, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl*; 441: 48-55, 2003.

FINEGOLD, S.M. Anaerobic Bacteria in Human Disease. *New York: Academic Press*, 1977.

FURRIE, E. - A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut* 2006 Feb; 55(2) 141-143 www.gut.bmj.com on 4 december 2007.

GASKINS, H.R; CROIX, A.J.; NAKAMURA, N.; NAVA, G.M. Impact the intestinal microbiota on the development of mucosal defense. *Clinical Infectious diseases*; v. 46 2008.

GEWIRTZ, A.T., NAVAS, T.A., GODOWSKI, P.J., MADARA, J.L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.*, 167:1882-5, 2001.

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.*; 28(1):19-25,1999.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet*; 361: 512-19, 2003.

HALL, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*; 41:95-98, 1999.

HAMOSH, M., SALEM Jr., N. Long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biol Neonate*, v. 74, p. 106-120, 1998.

HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; KITAHARA, M.; BENNO, Y. - Molecular Analysis Fecal Microbiota in Elderly Individuals Using 16S rRNA Library and T-RFLP. *Microbiol. Immuno.* 47(8), 557-570, 2003.

HOPPER, L.V. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature Reviews microbiology*; vol.7, p. 367-374, 2009.

KELLY D, CONWAY S. Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Mol Immunol.* v.42(8) p. 895-901, 2005.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p. 111-120, 1980.

LEVSKY J.M; SINGER R.H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci.* v. 116 p. 2833-8. 2003.

LINDBERG, E.; ADLERBERTH, I.; HESSELMAR, B.; SAALMAN R.; STRANNEGARD, I.L.; ABERG, N.; WOLD, A.E. High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. *Journal of Clinical Microbiology*; p. 530-534, 2004.

LONNERDAL, B. O. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 77, n. 6, p. 1537S-1543S, 2003.

LUNDEQUIST, B.; NORD, C.E.; WINBERG, J. - The composition of faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatr Scand*; 74: 45-51, 1985.

MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Probiotics, infection and immunity. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 15, p. 501-506, 2002.

MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. - Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.*; 69: 1035S-45S, 1999.

MAGALHAES J.G; TATTOLI I.; GIRARDIN S.E. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol.* v.2 , p. 106-15, 2007.

MATA LJ, MEJICANOS ML, JIMENEZ F. Studies on the indigenous gastrointestinal flora of Guatemalan children. *Am J Clin Nutr*, 25:1380-90, 1972.

MATHYS, S.; LACROIX, C.; MINI, R.; MEILE, L. – PCR and real-time PCR primers developed and identification of Bifidobacterium thermophilum in faeces. *BMC Microbiology*; 8:179, 2008.

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; KADO, Y.; TAKADA, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. – Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, p.167-173; 2004.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173:97, 2000.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immune Recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173:89-97, 2000.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. – The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Jornal de Pediatria*, vol. 82, nº5 (Supl), p. 189-197, 2006.

MOUNTTZOURIS, K.C.; MCCARTNEY, A.L.; GIBSON, G.R. - Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr.*; 87:405-20, 2002.

PALMER, C.; BIK, E.M.; DIGIULIO, D.B.; RELMAN, D.A.; BROWN P.O. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biology*, vol.5, p.1553-1573, 2007.

PENDERS, J.; STOBBRINGH, E.E.; THIJS, C.; ADAMS, H.; VINK, C.; VAN REE, VAN DEN BRANDT, P.A. – Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing. *Clin Exp Allergy*, v. 36 p. 1602-08. 2006.

PENNA, F.J.; NICOLI, J.R. - Microbiota intestinal normal: conceitos, composição e funções. *Temas de Pediatria*, nº 76. Nestlé Nutrição; 2003.

SAKATA, H.; FUJITA, K.; YOSHIOKA H. The effect of antimicrobial agents on the fecal flora of children. *Antimicrob Agents Chemother*, p.225-229, 1986.

SCHIFFRIN, E.J.; BLUM, S. - Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr*, 56(suppl 3):S60-S4, 2002.

SCHLOSS PD, et al., Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*; 75(23):7537-41, 2009.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing MOTUR, a Computer program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 1501–1506, 2005.

SIMHON A, DOUGLAS JR, DRASAR BS, et al. Effect of feeding on infants faecal flora. *Arch Dis Child*; 57:54-8, 1982.

STACKEBRANDT, E; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, p. 846–849, 1994.

TANNOCK, G.W. - Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*;73: 410S-4S, 2001.

TANNOCK, G.W. - The normal microflora: an introduction. In: Tannock GW, editor. *Medical Importance of Normal Microflora. Netherlands: Kluwer Academic Publishers*; p. 1-23,1999.

TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. - Microbiota ou flora normal do corpo humano. In: Trabulsi LR, Althertum F, editores. *Microbiologia*. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu; p. 101-109, 2004.

VAEL, C.; DESAGER,K. The importance of development of the intestinal microbiota in infancy. *Current Opinion in Pediatrics*; p. 794–800, 2009.

WALL, R.; ROSS, R.P.; RYAN,C.A.;HUSSEY,S.; MURPHY, B.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Role of Gut Microbiota in Early Infant Development. *Clinical Medicine: Pediatrics*, p.45-54, 2009.

WINKLER, P.; GHADIMI, D.;SCHREZENMEIR,J.; KRAEHENBUHL, JP. Molecular and Cellular Basis of microflora host interaction. *J Nutr.*;137(3 Suppl 2) p. 756S-72S, 2007.

YOSHIKA H, ISEKI K, FUJITA K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle fed infants. *Pediatrics* v. 72, p 317-2, 1983.



ZOETENDAL EG.; RAJILIC-STOJANOVIC M.; VOS WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Recent advances in basic science*; p. 1605-1615, 2008.

## ANEXOS

## ANEXO 1 - Comitê de Ética (Hospital Universitário – USP)



Fls. nº 78

Rubrica

São Paulo, 20 de agosto de 2005.

Il<sup>mo(s)</sup>. Sr<sup>ta(s)</sup>.

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

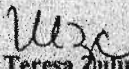
Prezado(a) Senhor(a)

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 Dufini da Costa  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HU/USP

**ANEXO 2 - Comitê de Ética (Hospital das Clínicas - USP)**

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 aprovada 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

### ANEXO 3 - Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido

Titulo – Flora normal da criança: desenvolvimento e características

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

#### Formulário de consentimento livre e esclarecido.

Eu, \_\_\_\_\_, pais ou responsáveis;

Estamos realizando um estudo sobre a flora intestinal das crianças. Flora intestinal responde 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 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 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 permitissem ao indivíduo a constituir uma flora mais saudável, trazendo benefícios para a saúde da criança 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

adas ao nascimento, com 15 dias e com 30 dias. A partir do segundo mês coletaríamos fezes  
almente 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  
ira com algodão na ponta (assemelha-se ao conhecido "cotonete"), que deverá ter uma  
ana porção introduzida suavemente no ânus da criança para retirada de uma amostra de fezes.  
rocedimento não deverá provocar dor na sua criança e pode ser comparado à colocação de um  
sitório.

Nos dias das coletas sua criança realizaria acompanhamento médico pediátrico sendo  
adas 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.  
ssitaríamos colher continuamente informações sobre os diversos alimentos que a criança  
er, assim como informações sobre fatos importantes ocorridos com a criança como doenças e  
e medicações.

Este acompanhamento não acarretará nenhum custo para os responsáveis, sendo toda  
sa 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  
vidas na pesquisa, garantindo que não serão tomadas medidas que possam de alguma forma  
dicar as crianças.

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

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

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

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.