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

Análise da diversidade da microbiota fecal de crianças de zero a doze meses de idade usando o método de eletroforese em gel com gradiente desnaturante

Isabel Irino Ramos Carvalho

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:
Profª. Titular Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2012

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

Análise da diversidade da microbiota fecal de crianças de zero a doze meses de idade usando o método de eletroforese em gel com gradiente desnaturante

Isabel Irino Ramos Carvalho

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:
Profª. Titular Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2012

Isabel Irino Ramos Carvalho

Análise da diversidade da microbiota fecal de crianças de zero a doze meses de idade usando o método de eletroforese em gel com gradiente desnaturante

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Titular Marina Baquerizo Martinez
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico este trabalho ao meu marido, Felipe, aos meus pais, Fernando e Celina, à minha irmã, Mariana, à minha tia, Kinue e às minhas avós, Kiwa e Leonildes.

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez,** agradeço pela oportunidade recebida. Pela sua orientação neste trabalho e por toda sua contribuição em meu aprimoramento profissional.

À **Profa. Dra. Carla Tadei**, por toda sua contribuição no auxílio da orientação deste trabalho.

Ao **Dr. Rubens Duarte,** por todo auxílio e colaboração dedicados à realização deste trabalho.

À minha irmã, **Mariana,** pelo companheirismo de todas as horas e por toda sua atenção dedicada a esta tese.

À **Silvia Toledo, Fernanda e Juliana,** por compartilharem da condução desta linha de pesquisa.

Aos colegas de laboratório, **Lucas, Renée, Juliana Campos, Fabiana, Elizabeth, Gilberto, Carol e Hadassa,** pela agradável convivência.

Aos amigos do SLC-HU **Silvinha, Lílian, Neide, Cristiane, Lelê, Mayara, Thiago, Denise, Marisa, Daniel, Vanda, Lisinha, Marlene, Ana Cris, Cilene, Lucilene, Ligia, Luciane, Célia e Daniela,** pela amizade, pelo apoio e incentivo.

Ao meu querido **Felipe,** por todo o seu amor, paciência, incentivo e compreensão. E por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus pais **Fernando e Celina** pelo apoio, incentivo e dedicação.

À minha tia, **Kinue Irino,** por seus exemplos pessoal e profissional**.**

Ramos-Carvalho, I. I. **Análise da diversidade da microbiota fecal de crianças de zero a doze meses de idade usando o método de eletroforese em gel com gradiente desnaturante**

A microbiota intestinal humana é um ecossistema complexo que abriga centenas de espécies bacterianas e que de um modo geral convive harmonicamente com o hospedeiro. Essa interação promove o desenvolvimento e estimulação do sistema imune. A microbiota tem papel primordial na saúde humana por produzir nutrientes, participar no metabolismo de carboidratos e por competir com bactérias patogênicas na colonização do ambiente intestinal. Ela alcança sua estabilidade em torno do segundo ano de vida. O tipo de parto, de alimentação, as condições sanitárias, sociais e os elementos do hospedeiro, como fatores genéticos, peristaltismo e pH intestinal, influenciam na sua composição. Quando há a instalação de infecções intestinais ou uso de antimicrobianos e de imunossupressores ocorre o desequilíbrio desse sistema. Esse estudo tem como objetivo avaliar o estabelecimento e a diversidade da microbiota intestinal em onze crianças a partir do segundo dia até o décimo segundo mês de vida. As amostras fecais das crianças foram coletadas no segundo e sétimo dias de vida e mensalmente do primeiro ao décimo segundo meses de vida. As análises de "fingerprinting" foram realizadas pelo método de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) usando os iniciadores para a região V3 do gene 16S *rRNA*. Os perfis de similaridade foram feitos a partir da construção de dendrogramas e para avaliar as relações entre as amostras temporais das crianças e o perfil de bandas obtido com o DGGE foram feitas análises de correspondência. A análise do "fingerprinting" mostrou que cada criança apresentou um padrão de colonização distinto. Apesar de compartilharem algumas características como a forma de nascimento, quadro sócio-econômico e terem condições sanitárias semelhantes, observaram-se diferenças no processo de estabelecimento da microbiota de cada uma delas, o que pode ser devido aos fatores individuais e particularidades da alimentação, do uso de medicamentos e das intercorrências infecciosas. As análises de correspondência mostraram agrupamentos temporais, onde as amostras mais tardias (a partir de 10 meses até 12 meses de idade) estão muito relacionadas entre si indicando o início da estabilização da microbiota ao final do 1º ano de vida. O uso da técnica de "fingerprinting" por DGGE permitiu uma análise global dos estágios diferentes no estabelecimento da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Microbiota intestinal, recém-nascidos, DGGE

Ramos-Carvalho, I. I. **Analysis of the intestinal microbiota of infants from zero to twelve months years old using the method Denaturing Gradient Gel Electrophoresis**

The human intestinal microbiota is a complex ecosystem that homes hundreds of bacterial species, which generally live in harmony with the host. This interaction promotes the development and stimulation of the immune system. The microbiota plays a major role in human health by producing nutrient involved in carbohydrate metabolism and competes with pathogenic bacteria in the colonization of the intestinal environment. The stability is achieved around the second year of life. The type of delivery, food, sanitation, and social elements of the host, such as genetic factors, peristaltism and intestinal pH, influence their composition. The imbalance of this system happens due the installation of intestinal infections, in the use of antibiotics and immunosuppressants. The aim of this study is to evaluate the establishment and the diversity of the intestinal microbiota of eleven children from the second day of life until the twelfth month of life. The fecal samples were collected from children in the second and seventh days of life and monthly from the first month to the twelfth month of life. Analyses of fingerprinting was performed by the method of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) using the primers for the V3 region of the 16S *rRNA* gene. The similarity profiles were made with the construction of dendrograms and to evaluate the relationships between the temporal samples of children and the profile obtained from the DGGE bands were made the correspondence analysis (CA). The fingerprinting analysis showed that each child had a distinct pattern of bands. Although sharing some characteristics such as delivery mode, socio-economic context and similar health conditions were observed differences in the process of establishment of the microbiota of each, which may be due to individual factors, the use of medicine and infectious complications. The correspondence analysis showed temporal clusters, where the later samples (from 10 months to 12 months of age) are closely related to each other indicating the beginning of the stabilization of the microbiota at the end of the first year of life. Using the technique of fingerprintin by DGGE allowed a comprehensive analysis of different stages in the intestinal microbiota establishment.

Keywords: Intestinal microbiota, infants, DGGE

Lista de Figuras

Figura 1 Padrão de bandas obtido de DNA bacteriano de cepas de referência utilizando-se o método de eletroforese em gel com gradiente denaturante (DGGE). 35

Figura 2 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 1. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 1. 39

Figura 3 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 2. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 2. 42

Figura 4 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 3. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 3. 44

Figura 5 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 6. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 6. 47

Figura 6 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 7. Método UPGMA, coeficiente de Dice. A seta indica a banda sequenciada. B. gráfico gerado pela análise de 50

correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 7.

Figura 7 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 8. Método UPGMA, coeficiente de Dice. A seta indica a banda sequenciada. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 8. 53

Figura 8 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 12. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 12. 56

Figura 9 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 13. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 13. 59

Figura 10 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 14. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 14. 62

Figura 11 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 15. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 15. 65

Figura 12 A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 17. Método UPGMA, coeficiente de Dice. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 17. 66

Figura 13 Criança 17 sem amostra de 2 dias, A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 17. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 17. 68

Figura 14 A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 2 dias. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 2 dias. 71

Figura 15 A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 7 dias. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 7 dias. 73

Figura 16 A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 1 mês. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 1 mês. 75

Figura 17 A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 3 meses. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as 77

bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 3 meses.

Figura 18 A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 6 meses. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 6 meses. 79

Figura 19 A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 12 meses. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 12 meses. 81

Figura 20 Dendrograma de similaridade gerado dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir de todas as amostras analisadas nesse estudo. Método UPGMA, coeficiente de Dice. 83

Lista de Tabelas

Tabela 1 Amostras de fezes coletadas 26

Tabela 2 Histórico mensal das crianças analisadas 85

Lista de Abreviaturas

AC	Análise de Correspondência
ATCC	American Type Culture Collection
CSEB	Centro de Saúde-Escola Butantan
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FISH	Hibridização Fluorescente in-sito
HU-USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
LPS	Lipopolissacarídeo
NOD	Nod-Like receptor
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SDS	Duodecilsulfato de Sódio
TGI	Trato Gastro Intestinal
TLR	Toll-like receptor
UFC	Unidade Formadora de Colônia

Sumário

1. Introdução.....15

2. Objetivos.....24

2.1 Objetivo geral.....24

2.2 Objetivos específicos.....24

3. Materiais e métodos.....25

3.1 Amostragem.....25

3.2 Coleta do material.....25

3.3 Acompanhamento e registro de informações.....27

3.4 Aspectos éticos.....27

3.5 Análise da diversidade da microbiota intestinal.....28

3.5.1 Extração de DNA.....28

3.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....29

3.5.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....29

3.5.4 Sequenciamento de bandas do DGGE.....30

3.6 Análises de dados.....32

3.6.1 Análises de agrupamento.....32

3.6.2 Análises de correspondência.....32

4. Resultados.....35

4.1 Padronização da reação de PCR.....35

4.2. Análise da diversidade da microbiota intestinal por PCR-DGGE.....36

5. Discussão.....88

6. Conclusões.....94

Referências.....95

Anexos.....100

Anexo 1 - Comitê de Ética (Hospital Universitário – USP).....100

Anexo 2 – Comitê de Ética (Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP).....101

Anexo 3 – Formulário de consentimento Livre e Esclarecido.....103

1. Introdução

A microbiota intestinal tem um importante papel na saúde humana. Esta microbiota é composta por uma grande diversidade e desempenha diferentes funções no hospedeiro humano, como a proteção constituindo uma importante barreira contra micro-organismos patogênicos além de participar do metabolismo de carboidratos, produzir nutrientes e ainda está diretamente envolvida na modulação do sistema imune (PENDERS, 2006).

O início da colonização do trato gastrointestinal ocorre logo após o nascimento. A partir desse momento começa uma sucessão ecológica na composição da microbiota intestinal humana (FAVIER, 2002). Os primeiros micro-organismos que colonizam o trato gastrointestinal (TGI) do recém-nascido são as bactérias provenientes da mãe e do meio ambiente. Desta forma o primeiro fator determinante na composição da microbiota intestinal é a forma de nascimento. Crianças nascidas por parto normal são colonizadas inicialmente por bactérias da microbiota vaginal materna. As primeiras bactérias que colonizam o TGI são as bactérias anaeróbias facultativas e posteriormente bactérias anaeróbias como *Bifidobacterium* e *Bacteroides*. Crianças nascidas por parto cesáreo são colonizadas primeiramente pelas bactérias presentes no ambiente hospitalar. A microbiota dessas crianças se apresenta mais heterogênea em relação às de crianças nascidas por parto normal (CAMPEOTTO, 2007).

Outros fatores que influenciam inicialmente a composição da microbiota intestinal são a prematuridade, enterocolite necrosante, doença inflamatória intestinal, condições de higiene e tipo de aleitamento (PENDERS, 2006). Crianças nascidas prematuramente tem um retardo no processo de colonização da microbiota intestinal.

A influência do aleitamento no recém-nascido influencia na composição da microbiota. Em recém-nascidos amamentados por fórmulas foi observada uma maior densidade de *Clostridium* sp, *Bacteroides*, Enterococos e Enterobactérias em

relação aos recém-nascidos amamentados com leite materno (ADLERBERTH, 2008).

O leite materno contém os nutrientes necessários ao crescimento do recém-nascido e também contém uma grande variedade de fatores protetores como imunoglobulinas (IgA), ácidos graxos, oligossacarídeos, lisozima e lactoferrina. Esses fatores protegem o recém-nascido de infecções (MATÍN, 2007). Os grupos bacterianos mais frequentemente encontrados no leite materno são estafilicocos, estreptococos, corynebacterias, lactobacilos, micrococos, propionibacterias e bifidobactérias. A origem dessas bactérias é a microbiota existente na pele e no mamilo (MORELLI, 2008). O predomínio de bifidobactérias em recém-nascidos amamentados com leite materno se dá pelo fato do leite materno conter galactoligossacarídeos que atuam como prebióticos para as bifidobactérias (GRÖNLUND, 2007).

Ao longo do trato gastrointestinal existem diferentes ambientes que variam em potencial de óxi-redução, pH, disponibilidade de nutrientes e velocidade de fluxo. Essas diferenças nos ambientes refletem na composição da sua microbiota (OUWEHAND; ISOLAURI; SALMINEN, 2002). Na cavidade oral encontram-se mais de 400 espécies bacterianas, sendo os gêneros mais comumente encontrados: *Streptococcus*, *Veillonella* e *Actinomyces*. O esôfago não apresenta uma microbiota residente. Devido ao baixo pH do estômago a concentração da microbiota nesse ambiente é muito baixa varia de 0 a 10^{2} UFC/ mL de suco gástrico. Os micro-organismos encontrados no estomago são *Candida*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Helicobacter pylori* e *Peptostreptococcus* (OUWEHAND; ISOLAURI; SALMINEN,, 2002).

No duodeno a composição da microbiota, composta principalmente por *Lactobacillus* e *Streptococcus*, relembra a composição da microbiota do estômago devido ao seu baixo pH. No jejuno há um aumento no pH, que passa para 8, observa-se o aumento na concentração da microbiota que agora está em torno de 10^{5} a 10^{7} UFC/ mL de conteúdo intestinal. Sua microbiota normalmente é composta por *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Bacteroides*, *Corynebacterium* e *Actinomyces* (OUWEHAND; ISOLAURI; SALMINEN, 2002). Devido à passagem lenta através do íleo ocorre um pequeno aumento na concentração da

microbiota nesse ambiente, 10^{7} a 10^{8} UFC/ mL, composta de bactérias anaeróbias facultativas como enterobactérias e enterococos e anaeróbias estritas como *Bacteroides*, os gêneros *Veillonella*, *Clostridium*, *Lactobacillus* (OUWEHAND; ISOLAURI; SALMINEN,, 2002).

O cólon apresenta a maior densidade e diversidade na microbiota em relação ao restante do organismo. Aqui a concentração de micro-organismos está entre 10^{11} a 10^{12} UFC/ mL de conteúdo intestinal (OUWEHAND; ISOLAURI; SALMINEN,, 2002). As amostras que são colhidas por biópsia do cólon intestinal não estão livres de contaminação, pois o fluido fecal está constantemente presente na mucosa intestinal. Porém ainda não está claro na literatura se o que está sendo descrito é a composição da microbiota da mucosa ou da contaminação pela comunidade fecal. Deste modo, alguns estudos demonstraram que a microbiota fecal reflete a microbiota do colón intestinal (TANNOCK, 2005).

Como descrito anteriormente os principais micro-organismos que inicialmente colonizam o trato gastrointestinal de recém-nascidos são as bactérias anaeróbicas facultativas, como *Escherichia coli*, outras enterobacterias, estafilococos, estreptococos e enterococos. Estes micro-organismos modificam o ambiente intestinal, consumindo o grande teor de oxigênio inicialmente encontrado, tornando o intestino um ambiente propício para a colonização por bactérias anaeróbias obrigatórias, como os bacterióides, bifidobactérias e fusobactérias (ADLERBERTH, 1999).

Estas modificações acontecem em torno da primeira semana de vida, e acredita-se que o processo de instalação da microbiota alcance estabilidade em torno do segundo ano de vida da criança. 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 (SCHIFFRIN, 2002).

Para colonizar permanentemente um sítio do intestino, que caracteristicamente tem uma 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 uma microbiota residente chamada indígena ou autóctone, que convive harmonicamente com o hospedeiro, tornando-se patogênica somente quando o ecossistema é perturbado de alguma forma. Sua população, uma vez estabelecida, tende a ser estável em tamanho e ao longo do tempo, sem a necessidade de reintroduções periódicas de bactérias (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999).

Bactérias que apenas passam através do 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 circunstâncias anormais (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999). A estabilidade da microbiota é um processo ativamente mantido através das inter-relações entre bactérias e entre estas e o hospedeiro (SCHIFFRIN; BLUM, 2002).

A microbiota bacteriana intestinal normal tem papel fundamental na proteção ecológica do hospedeiro impedindo o estabelecimento de bactéria patogênica no TGI. Este fenômeno é conhecido como “resistência à colonização”, “interferência microbiana” ou “efeito barreira”. Entre os mecanismos usados pelas bactérias aponta-se a produção de substratos que inibiria o crescimento das bactérias patogênicas (antagonismo), competição por nutrientes e competição por sítios de adesão (THOMPSON-CHAGOYÁN; MALDONADO; GIL, 2007).

O intestino é o maior órgão imunológico do organismo humano. Ele produz a maior parte de anticorpos de todo o organismo, aproximadamente 40 mg/kg de massa corpórea/dia, e contém 80% de todas as células produtoras de anticorpos do organismo (HELGELAND, 1999 em OUWEHAND, 2002). 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 comuns. O efeito estimulante da microbiota no tecido imunológico do hospedeiro acredita-se estar envolvido em aspectos da resistência que são importantes nos estágios inicias das infecções pelos patógenos.

No TGI existe um estado de modulação imunológica constante. Ao mesmo tempo em que o sistema imunológico está pronto para reagir contra bactérias patogênicas, é capaz também de se manter tolerante em relação à microbiota, sendo esta capacidade chamada de tolerância oral, que é um processo ativamente mantido (PENNA; NICOLI, 2003; SCHIFFRIN, 2000).

A mucosa intestinal representa a interface entre o organismo e o meio externo nela estão localizados linfócitos intra-epiteliais, principalmente linfócitos T citotóxicos e supressores e linfócitos B que secretam imunoglobulina IgA. Os linfócitos também estão organizados na mucosa em estruturas linfóides MALT (mucosal-associated lymphoid tissue), no caso do intestino GALT (gut- associated lymphoid tissue) (MAGALHAES; TATTOLI; GIRARDIN, 2007). O epitélio intestinal é recoberto por uma camada de muco que o separa do lúmen intestinal e é composto principalmente por mucinas, que são glicoproteínas secretadas pelas células caliciformes. As mucinas formam a primeira barreira de defesa entre o meio externo e as células epiteliais. O epitélio é formado majoritariamente por células epiteliais polarizadas. Essas células estão conectadas umas às outras pelas “tight junctions” o que modula a permeabilidade do epitélio. Outra barreira importante do mecanismo de defesa não específico é a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células de Pannet presentes nas criptas da mucosa intestinal. Na imunidade inata as células de defesa (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) respondem inicialmente através de receptores de reconhecimento de padrões moleculares nos micro-organismos denominados PRR (pattern recognition receptors). Os micro-organismos possuem estruturas chamadas de padrões moleculares associados a patógeno (PAMP) que são reconhecidas pelos PRR. Quando há o reconhecimento de micro-organismos pelos macrófagos ocorre a ativação de sinais para a fagocitose e resposta inflamatória. As bactérias que atravessam as mucinas e que resistem aos peptídeos antimicrobianos se aproximam intimamente ao epitélio e são reconhecidas pelos receptores localizados na membrana chamados de TLR (Toll-like receptors). Diferentes TLR reconhecem diferentes estruturas microbianas, TLR2 reconhece peptideoglicano e ácido lipoteicóico; TLR3 reconhece RNA- dupla-fita, em vírus; TLR4 reconhece lipopolissacarídeos (LPS), componente da parede de bactérias Gram-negativas; TLR5 reconhece a flagelina. A ligação desses receptores com as estruturas dos micro-organismos ativa quinases e fatores de transcrição, como NF-

kB e STAT-1, com subsequente produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas. No citossol dos fagócitos há outra classe de receptores de reconhecimento de padrões denominados NOD (nucleotide-binding oligomerization domain). NOD1 e NOD2 estão envolvidos no reconhecimento de peptideoglicano e esse reconhecimento também ativa via de sinalização NF-kB induzindo a produção de mediadores inflamatórios e ativação de apoptose de macrófagos (MAGALHAES, 2007; KELLY, 2005; TLASKALOVA-HOGENOVA, 2011).

As bactérias não patogênicas da microbiota intestinal inibem a ativação da via inflamatória desencadeada por NF-kB (MAGALHAES; TATTOLI; GIRARDIN, 2007). Para a ativação via TLR4 é necessário o reconhecimento do co-receptor CD14 nos macrófagos. Como nos macrófagos intestinais há uma baixa expressão de CD14 não se tem a cascata de sinalização ativada a todo momento, o que explicaria a resistência aos efeitos pro-inflamatórios ocasionados pela microbiota residente (TLASKALOVA-HOGENOVA, 2004).

Outra função atribuída à microbiota intestinal está relacionada à sua contribuição para a nutrição e metabolismo do hospedeiro. Esta contribuição pode ser evidenciada pela sua capacidade de interferir no pH do intestino e na motilidade intestinal, favorecendo a absorção de íons e água e na diferenciação de células da mucosa. A microbiota ainda exerce atividade enzimática produzindo vitamina K e outras vitaminas (LIN et al., 2005).

As bactérias são responsáveis pela fermentação de uma série de substratos que chegam ao lúmem colônico não digeridos, principalmente carboidratos. A maioria dos produtos ácidos resultantes desta fermentação é reabsorvida pela mucosa colônica, ocorrendo o chamado salvamento energético (PENNA; NICOLI, 2003).

O organismo humano não possui algumas enzimas necessárias para a fermentação de alguns carboidratos. Esses carboidratos são metabolizados no cólon pelas bactérias sacarolíticas e transformados em substâncias que podem ser usadas pelo organismo como os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA). Em particular o butirato que é absorvido no epitélio e tem papel na proliferação celular, síntese de membrana, na absorção de sódio e inibe a produção de citocinas pro-inflamatórias (MAGALHAES; TATTOLI; GIRARDIN, 2007).

Como descrito anteriormente, a composição e atividade da microbiota intestinal indígena tem uma enorme importância nos processos imunológicos, nutricionais e patogênicos no ser humano, em consequência na manutenção da saúde do indivíduo. O conhecimento, portanto 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 manipular. Sabe-se que as primeiras bactérias que colonizam o TGI parecem ter um importante papel na regulação da colonização subsequente. Estas bactérias iniciais poderiam modular a expressão genética das células epiteliais do hospedeiro, criando, portanto, um ambiente favorável para elas mesmas, e podendo prevenir o crescimento de outras bactérias introduzidas posteriormente. Assim a qualidade da colonização inicial do intestino teria possivelmente, um papel crítico no processo de seleção entre os diferentes gêneros bacterianos, trazendo consequências para toda a vida (GROLUND et al., 1999). Fica claro que um maior impacto poderia ser obtido com intervenções na fase de instalação da microbiota na infância.

O manejo da microbiota intestinal durante o período de colonização tem sido sugerido através do uso de prebióticos, que são componentes alimentares não digeridos pelo organismo humano e que possuem efeito benéfico por estimular o crescimento e/ou atividade de bactérias no cólon promovendo assim a saúde (SHERMAN et al., 2009) e probióticos, micro-organismos vivos que estimulam a imunomodulação na mucosa intestinal, 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 et al, 2003).

O trato gastrointestinal (TGI) alberga o maior numero e a maior diversidade de coleções bacterianas que colonizam o corpo humano. Embora as bactérias possam ser encontradas em todo TGI, maior número de bactérias residem no cólon e ceco. Mais de 99% da microbiota fecal cultivável é representada por apenas 30-40 % das espécies bacterianas, refletindo a dificuldade ainda existente em se conhecer toda 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 (PEARSON; LIMPMAN, 1988).

A microbiota intestinal humana tem sido tradicionalmente comparada pela análise de isolados a partir de métodos de culturas de anaeróbios estritos e facultativos. O conhecimento da microbiota intestinal humana ainda é bastante restrito quando nos atemos aos estudos baseados em métodos de cultivo (HAYSHI et al., 2003).

Um marco decisivo para evolução dos métodos de análise das comunidades bacterianas foi a descoberta de uma sub-unidade do RNA ribossomal, o 16S *rRNA* que contém regiões de sequências de bases de nucleotídeos, que são altamente conservadas dentro do domínio bacteriano, e que são intercaladas por regiões variáveis a altamente variáveis (Regiões V1-V9). A partir disto, foram desenvolvidos métodos moleculares para estudo da microbiota fecal, nos quais as bactérias constituintes de uma amostra fecal são identificadas a partir do seu material genético (16S *rRNA*) presente na amostra, independente de serem ou não cultiváveis (TANNOK, 2005).

Diferentes métodos moleculares podem ser utilizados para a análise filogenética da microbiota intestinal. A construção de bibliotecas genômicas é considerada padrão ouro para análises de filogenia da microbiota intestinal humana. Essa técnica baseia-se na amplificação do gene 16S *rRNA*, seguindo-se da clonagem desse produto de amplificação e posterior sequenciamento e análise dos clones gerados (ZOETENDAL et al., 2011).

No método de FISH (Hibridização Fluorescente In Situ) são utilizadas sondas de oligonucleotídeos marcadas com componente fluorescente que hibridizam com o material genético presente na amostra. O método quantifica os micro-organismos marcados na amostra (FAVIER, 2002; ZOETENDAL et al, 2011).

A técnica de PCR em tempo real também tem sido utilizada para a quantificação de diferentes grupos filogenéticos com a utilização de iniciadores e sondas grupo-específicos. A metodologia apresenta grande sensibilidade, pois pode identificar a presença de micro-organismos em quantidades inferiores às necessárias nas outras metodologias convencionais devido ao menor limite de detecção da técnica (ZOETENDAL et al., 2011).

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) com o qual se pode determinar, descrever e monitorar a diversidade da comunidade microbiana de amostras de fezes. 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; VOS; AKKERMANS, 2003). Esta metodologia tem sido empregada para se analisar a estrutura e a evolução de comunidades bacterianas e determinar sua dinâmica em resposta a variações ambientais (ERCOLINI, 2004). Dessa forma o DGGE é uma ferramenta na detecção de mudanças na estrutura de comunidades microbianas em função da evolução temporal.

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 uréia e formamida, em uma temperatura de 60ºC. À medida que migram pelo gel, as fitas de DNA alcançam uma concentração específica de desnaturação e se dissociam progressivamente devido à composição de bases (GROMPE, 1993). A separação por eletroforese em gel de agarose convencional resultaria em uma única banda não descritiva (MUYZER; SMALLA, 1998).

Embora para a análise da microbiota intestinal humana e animal é frequentemente empregado o uso de iniciadores para as regiões variáveis V6-V8, estas, apresentam valores de riqueza menores quando comparados às regiões V3-V5. Além disso, a região V3 apresenta o maior número de bandas no gel de DGGE resultando em um perfil mais informativo (YU; MORRISON, 2004).

Apesar da importância do tema exposto, ainda existem lacunas no conhecimento sobre o ecossistema intestinal, seu desenvolvimento e suas características, sendo o déficit de informações em nosso país mais acentuado, não tendo sido encontrada literatura sobre a instalação e composição da microbiota intestinal das crianças brasileiras.

Neste estudo, com o uso da técnica de PCR-DGGE, foi analisada a evolução da comunidade bacteriana de uma mesma criança ao longo de seu primeiro ano de vida bem como a diversidade bacteriana entre crianças pertencentes a uma mesma comunidade expostas a condições ambientais diversas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o estabelecimento e a diversidade da microbiota bacteriana do tubo gastrintestinal de lactentes humanos em estudo longitudinal durante o primeiro ano de vida.

2.2 Objetivos específicos

- Acompanhar a instalação da microbiota intestinal no recém-nascido desde o nascimento até completar o primeiro ano de vida analisando a sua composição e a evolução temporal.
- Observar a relação do aleitamento, do desmame e da dieta com a colonização intestinal.
- Observar a relação das intercorrências infecciosas e uso de medicações na instalação ou estabilidade da microbiota.

3. Materiais e métodos

3.1 Amostragem

O grupo estudado foi composto por onze lactentes nascidos no Hospital Universitário – USP (HU-USP).

Foram selecionadas crianças de mães saudáveis que realizaram o pré-natal no HU-USP, nascidas a termo por parto vaginal, com peso adequado (entre 2.500 e 4.000g), sem nenhuma enfermidade aparente e índice de Apgar $\geq$ 8.

3.2 Coleta do material

No estudo foram analisadas amostras de fezes coletadas no 2º e 7º dias de vida e mensalmente a partir do primeiro ao décimo segundo mês de vida (Tabela 1). As coletas das amostras de fezes foram realizadas por duas metodologias. As amostras de 2 dias a 3 meses foram coletadas 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 coletadas pós-evacuação e mantidas a seco sob refrigeração até o momento da entrega no Centro de Saúde-Escola Butantã (CSEB).

As amostras de fezes foram transportadas refrigeradas até o laboratório. Onde então, foram aliquotadas em 200mg e armazenadas em freezer -80ºC até o momento da análise.

Tabela 1 – Amostras de fezes coletadas

	Amostras de fezes										
Período de coleta	**Criança 1**	**Criança 2**	**Criança 3**	**Criança 6**	**Criança 7**	**Criança 8**	**Criança 12**	**Criança 13**	**Criança 14**	**Criança 15**	**Criança 17**
2 dias		2A/2B	3.1	-	7.1	-	12.1	13.1	14.1	15.1	17.1
7 dias	1.2	2.2	-	6.2	7.2	-	12.2	13.2	14.2	15.2	17.2
1 mês	1.3	-	3.3	-	-	-	12.3	13.3	14.3	15.3	17.3
2 meses	-	-	-	-	-	8.4	12.4	-	-	15.4	-
3 meses	1.5	-	-	6.5	7.5	8.5	-	-	14.5	-	-
4 meses	-	2.6b	3.6	-	7.6	8.6	-	-	-	-	-
5 meses	1.7	-	3.7	-	-	-	-	-	14.7	15.7 A/B e 15.8	17.7
6 meses	1.8	2.9		-	-	-	-	13.8	14.8	15.9	17.8
7 meses	-	-	3.9	-	-	-	12.9	13.9	14.9	15.10	17.9
8 meses	1.9	-	-	6.11	7.8	8.8	12.10	13.10	14.10	15.11	-
9 meses	-	-	3.11	6.12		8.9	12.11	13.11	14.11	15.12	17.10
10 meses	1.11	2.13	3.12	6.13	7.10	8.10	12.12	13.12	14.12	-	17.11
11 meses	1.12	2.14	3.13	-	7.11	8.11	-	13.13	14.13	-	17.12
12 meses	1.13	2.15	3.14	-	7.12	8.12	12.13	13.15	14.14	15.16	-
13 meses	1.14	2.16	-	-	-	-	12.14	-	-	-	17.13
15 meses	-	-	-	-	7.15	-	-	-	-	15.17	17.14
16 meses	-	-	-	-	-	-	12.15	13.16	-	-	-

3.3 Acompanhamento e registro de informações

Foram coletadas informações concernentes à condição sócio econômica da família como renda familiar, tipo de moradia, número de moradores na residência e condições sanitárias.

A dieta da criança foi acompanhada periodicamente e registrada a forma de aleitamento e período, época de introdução de novos alimentos e especificação dos mesmos. As mães registraram as informações em formulário padronizado. Os registros das informações foram feitos durante o acompanhamento mensal da criança. Foram registradas as ocorrências de intercorrências infecciosas e uso de medicamento, como o uso de antimicrobianos (Tabela 2).

3.4 Aspectos éticos

O estudo foi iniciado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HU (Anexos 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 do estudo e o consentimento da mãe foi assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

Toda necessidade 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.

3.5 Análise da diversidade da microbiota intestinal

Na análise da diversidade da microbiota intestinal empregou-se a metodologia da eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE). O DNA total foi extraído das amostras de fezes e os fragmentos da região V3 do 16S rRNA foram amplificados por PCR com a utilização de oligoiniciadores específicos para essa região do gene. Os produtos de PCR foram separados por DGGE. Para essa análise foram utilizados os procedimentos a seguir:

3.5.1 Extração de DNA

A obtenção do DNA do material fecal coletados em suspensão na solução de TE (10 μM Tris-HCl; 0,1 μM EDTA; pH 7,6), foi feita de acordo com Ausubel *et al*. (1999), com algumas modificações. As amostras de fezes foram fracionadas em alíquotas de 560 μL e acrescidas de 30 μL de dodecil-sulfato de sódio (SDS), a 10 %, e 6 μL de proteinase K (20 mg/ mL). Após homogeneização em vortex, as amostras foram incubadas a 37 °C, por 1h. Após incubação, foram adicionados 100 μL de NaCl (5 M) e o tubo foi levemente homogeneizado com as mãos. Adicionaram-se 80 μL 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 μL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 200 g, por 5 minutos, a 4 °C.

Após a centrifugação, 650 μL 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 μL de isopropanol, o tubo foi levemente homogeneizado e centrifugado a 200 g, por 30 minutos.

Foi descartado o sobrenadante e o sedimento 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 uL de H2O MilliQ estéril, incubados a 37 °C, por 1 hora, para completa homogeneização, e mantidas a -20 °C até o momento do uso..

A obtenção do DNA do material fecal coletado diretamente em frasco seco foi alisada segundo HAYASHI *et al* (2003), utilizando o kit para isolamento de DNA genômico de amostras de fezes QIAmp DNA Stool Mini (Quiagem) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de DNA extraído das fezes foi feita no NanoDrop (Thermo Scientific) e a qualidade do material genético avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,1%. O DNA extraído foi mantido à temperatura de – 20 °C para conservação.

3.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Na reação de PCR foi utilizado um par de iniciadores para a região variável V3 (F338-GC 5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3' e R518 5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3') do gene 16S *rRNA* bacteriano (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993). A reação foi otimizada para um volume final de 25 μL: tampão 1X, $MgSO_4$ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, oligoiniciadores 0,2 mM, Taq hi-fidelity 0,1 U (Invitrogen) e 20 ng DNA. Foi empregado o seguinte programa de amplificação: 97°C por 3 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 20 segundos e 68°C por 40 segundos e uma extensão final a 68°C por 7 minutos.

3.5.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Os fragmentos da amplificação pela reação de PCR da região V3 do gene 16S *rRNA* com tamanho de 180pb foram separados em gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturante. Foi aplicado no gel em média

750 ng de DNA amplificado de cada amostra e controles. A separação dos fragmentos permite a avaliação do perfil da diversidade da microbiota intestinal das crianças através do padrão de bandas obtido (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

Para a eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE) utilizou-se o sistema DCode (BioRad, The DCode^{TM} Universal Mutation Detection System) com um gel vertical de poliacrilamida com concentração de 8% (acrilamida/bis-acrilamida, 37,5:1) e dimensões 160 X160 X 1 mm em tampão TAE 0,5 X pH8 e com um gradiente de desnaturante entre 30 e 70% (solução desnaturante 100%: uréia 7M e formamida 40%). A eletroforese foi processada a 60ºC, 60 V por 16 h em tampão TAE 0,5 X (BURR et al., 2006; FAVIER, 2002; SUCHODOLSKI et al., 2004).

A coloração do gel foi feita com solução de $AgNO_3$ a 0,1% (SANGUINETTI; NETO; SIMPSON, 1994). Após a coloração dos géis, suas imagens foram normalizadas e analisadas no *software* BioNumerics (BioNumerics 6.6, Applied Maths, Bélgica).

3.5.4 Sequenciamento de bandas do DGGE

As bandas presentes em cada perfil representam a população dominante na comunidade microbiana que está sendo estudada. Flutuações na microbiota ao longo do tempo, isto é, o aparecimento e o desaparecimento de bandas dos perfis, refletem a mudança na composição da comunidade microbiana. Devido ao fato de poder haver concatenação de bandas no gel de DGGE, para a identificação de determinada banda, foi realizada a clonagem seguida de sequenciamento do DNA extraído dessa banda.

A banda de interesse foi cortada do gel de poliacrilamida e incubada por 24 horas a 4ºC em 35 μL de água ultra pura estéril para eluição do DNA. 5 μL do DNA eluído foram utilizados para a reamplificação do fragmento. Foi realizada a mesma reação, mas com o iniciador F338 sem o grampo de GC. Ao

término da reação foi adicionada ao produto uma cauda poliA para aumentar a eficiência da clonagem.

Após a reamplificação o produto de PCR foi avaliado quanto à qualidade e especificidade da reação através de eletroforese em gel de agarose 0,1 %. O produto de PCR foi purificado com kit comercial Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin (GE) conforme as instruções do fabricante.

Na clonagem a reação de ligação entre inserto e vetor foi feita com o produto de PCR purificado e o vetor pCR2.1-TOPO do TOPO-TA-Cloning kit (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O produto de ligação foi inserido em células competentes DH5α por choque térmico e semeado em placas de LB-ágar contendo Kanamiciana com concentração final de 50 mg/ mL. As placas foram incubadas por 18-24 horas a 35 $\pm$ 2 ºC. O lisado bacteriano de cada clone selecionado na placa de LB-ágar-Kanamicina foi amplificado em reação de PCR com o iniciador M13.

Para a reação de sequenciamento foi utilizada uma concentração de 3 ng/μL do produto purificado da amplificação com o iniciador M13 e seguido o protocolo do kit Byg Dye terminator (Applied Biosystems). O iniciador utilizado nessa etapa foi o T7. A eletroforese em sequenciador foi realizada no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP. As sequências de nucleotídeos obtidas dos cromatogramas foram comparadas ao banco de dados do NCBI através do programa BLAST.

3.6 Análises de dados

3.6.1 Análises de agrupamento

A análise de agrupamento separa as amostras em grupos que compartilham características semelhantes (perfis de conjuntos de bandas) a partir de uma matriz de similaridade que foi gerada da matriz presença e ausência obtida dos dados dos géis de DGGE. O gráfico gerado por essa técnica denomina-se dendrograma, que em forma de árvore relaciona o nível de similaridade (em escala numérica contínua) na vertical e as amostras na ordem de agrupamento na horizontal (ALVES; BELDERRAIN; SCARPEL, 2007).

Para a avaliação do perfil da diversidade das amostras e cálculo do coeficiente de Dice, com tolerância de 1 %; método UPGMA utilizou-se o programa BioNumerics (BioNumerics 6.6, Applied Maths, Bélgica). O coeficiente de similaridade entre duas amostras leva em consideração o número total de bandas apresentadas no DGGE e o número de bandas comuns, presentes nessas duas amostras. A equação $Cs = [(2 \times J)/(a + b)] \times 100$ foi utilizada para o cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) entre duas amostras (ex.: amostra 1 e amostra 2). Onde **a** é o número de bandas da amostra 1, **b** é o número de bandas da amostra 2 e **J** é o número de bandas comuns entre as duas (SUCHODOLSKI et al., 2004). Para dois perfis idênticos no DGGE o valor do coeficiente de similaridade é de 100 %, e perfis completamente diferentes tem valores iguais a zero %.

3.6.2 Análises de correspondência

Análise de correspondência é uma forma de análise multivariada para o estudo das comunidades microbianas. Associa o perfil de bandas com a evolução temporal da criança, bem como, faz associação com os dados de

fatores externos como aleitamento, alimentação, o uso de medicamentos e ocorrência de quadros infecciosos.

A AC estuda a correspondência entre variáveis atribuindo-lhes dados nominais enquanto a análise de agrupamento atribui valores numéricos de distância. Esse método permite a visualização gráfica das relações mais importantes entre as variáveis de um conjunto (ALVES, 2007). A AC parte de um conjunto da matriz de dados de presença/ausência e origina um gráfico bidimensional que exibe as colunas (bandas/espécies) e linhas (amostras temporais) dessa matriz como pontos de um espaço vetorial estabelecendo relações entre elas (NETO; MOITA, 1998). Nessa representação bidimensional é possível observar pontos mais próximos (mais semelhantes e mais relacionados entre si) e pontos mais distantes. A associação das variáveis que são geradas no gráfico é devida às relações que existem entre essas variáveis (FREITAS; JANISSEK-MUNIZ, 2008). Em relação às bandas (espécies), quanto mais próximas e direcionadas elas estão em relação a uma amostra mais específica essa banda (espécie) é dela.

A análise de correspondência canônica (AC) é feita a partir das variáveis contidas na matriz de presença e ausência (dados binários) gerada pelos dados obtidos nos géis de DGGE.

Pela AC é possível identificar a particularidade da presença de determinada espécie, neste caso, de bandas, que está relacionada a um determinado quadro (idade, alimentação, medicamentos, doenças). Desse modo com o uso da AC podemos confirmar os dados gerados pela análise de agrupamento baseada nos dados de DGGE.

Na análise multivariada as técnicas utilizadas (AC, por exemplo) analisam simultaneamente todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados (amostras temporais e espécies/bandas). Assim tanto a análise de agrupamento quanto a análise de correspondência são técnicas de interdependência, pois tratam simultaneamente de todas as variáveis em estudo (ALVES; BELDERRAIN; SCARPEL, 2007). Na análise de correspondência (AC), por ser uma análise não paramétrica, os resultados dependem exclusivamente das características da amostra.

A correlação entre as amostras e o perfil de bandas gerado por DGGE foi determinada pela análise de correspondência canônica (AC) realizada com o auxilio do programa Canoco (Canoco 4.5, Bimetrics, Wageningen, Holanda). As bandas presentes nos géis de DGGE foram consideradas como espécies.

A análise multivariada da composição da microbiota intestinal permitiu avaliar em conjunto os perfis de bandas e as amostras temporais de cada criança. Essa correlação entre amostras e bandas, que foram consideradas como espécies, foi feita com a utilização do *software* Canoco 4.5 gerando um gráfico bidimensional. O eixo 1 do gráfico (abscissa) representa a porcentagem da variância que mais explica essa correlação (primeira dimensão) e o eixo 2 (ordenada) representa a porcentagem da variância que mais explica essa correlação depois da primeira dimensão (segunda dimensão) e assim sucessivamente para a terceira e quarta dimensões. Os gráficos de AC apresentados nas análises desse estudo foram construídos com a primeira e a segunda dimensões, já que essas são as que mais explicam a porcentagem variância da correlação entre as amostra/bandas. Desse modo para a interpretação do gráfico observamos a distribuição das amostras e espécies/bandas em relação à proximidade entre elas e distribuição ao longo dos eixos 1 e 2. O quadrante em que se encontram amostras/bandas não é considerado na análise, e sim a distribuição das amostras/bandas no gráfico como um todo. Assim consideramos amostras mais próximas entre si como amostras mais semelhantes devido aos seus perfis de espécies/bandas mais inter-relacionados. Além de considerarmos a distância milimétrica entre amostras, consideramos também a distância entre bandas e amostras, sendo as bandas localizadas mais próximas da origem (junção dos eixos 1 e 2) as mais compartilhadas entre a maioria e/ou todas as amostras. E as bandas distribuídas pelos quadrantes do gráfico mais relacionadas/presentes em determinada amostras, ou seja, bandas amostras específicas.

4. Resultados

4.1 Padronização da reação de PCR

A padronização da reação de PCR para a região V3 do 16S *rRNA* foi feita com cepas de referência do banco de cepas American Type Culture Collection (ATCC). Foram selecionadas cepas bacterianas padrões cultiváveis dos principais gêneros encontrados na microbiota intestinal (Figura 1).

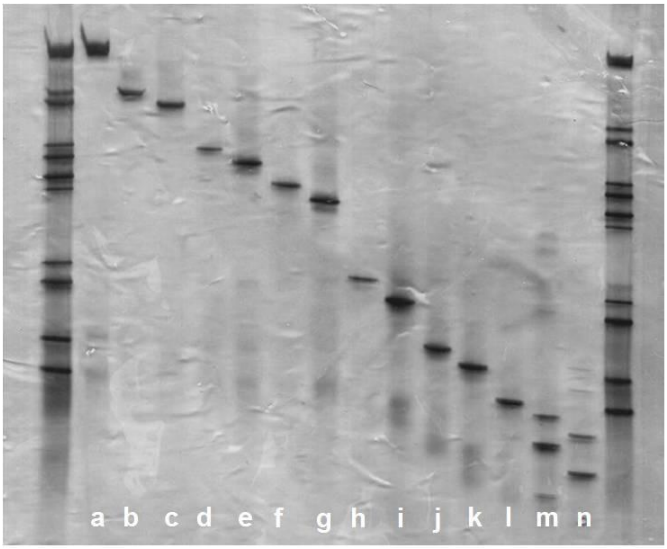


Figura 1 - Padrão de bandas obtido de DNA bacteriano de cepas de referência utilizando-se o método de eletroforese em gel com gradiente denaturante (DGGE): a) *Bacteroides fragillis* ATCC 25285, b) *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, c) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, d) *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, e) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, f) *Enterococcus faecallis* ATCC 51229, g) *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, h) *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, i) *Escherichia coli* ATCC 51446, j) *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, k) *Clostridium perfringens* ATCC 12924, l) *Clostridium difficile* ATCC 9689 m) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e n) *Enterobacter cloacae* ATCC 23355.

As cepas ATCC foram usadas como marcadores nos géis de DGGE para sua normalização durante a análise dos perfis de bandas das amostras no programa BioNumerics 6.6.

A otimização da reação de PCR para região V3 do gene 16S rRNA foi feita com os iniciadores F338-GC e R518 (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993) e as cepas de referência ATCC. Algumas cepas bacterianas apresentam um padrão de bandas e não apenas uma banda única espécie-específica como resultado da amplificação da região V3 o que é devido a presença de cópias heterogêneas do gene 16S *rRNA* em algumas espécies (Figura 1 – m e n) (ROUDIÈRE et al., 2009).

Após a padronização da reação de PCR todas as amostras foram amplificadas para a região V3 com o mesmo protocolo.

4.2. Análise da diversidade da microbiota intestinal por PCR-DGGE

A análise do estabelecimento e da diversidade da microbiota bacteriana intestinal das onze crianças estudadas no período de 1 ano de vida foi feita pela técnica de PCR-DGGE através da amplificação da região V3 do gene 16S *rRNA*. Os dados obtidos dos géis de DGGE foram analisados por agrupamentos hierárquicos construídos a partir de uma matriz de distância com o *software* BioNumerics 6.6 empregando-se o coeficiente de Dice; método UPGMA e por análise de correspondência canônica (AC) realizadas no *software* Canoco 4.5.

Os resultados obtidos dos agrupamentos (dendrogramas de similaridade) e das análises de correspondências foram associados às informações obtidas nos prontuários das crianças ao longo desse período.

As amostras das diferentes crianças também foram analisadas em conjunto em determinados períodos de tempo: nos primeiros 2 dias, no sétimo dia, primeiro mês, terceiro, sexto e décimo segundo meses de vida.

A utilização da técnica de PCR-DGGE permitiu a análise simultânea de todas as amostras de uma mesma criança juntas em um mesmo gel. Os perfis gerados pelo DGGE mostraram que no início da colonização é observado um menor número de bandas. A introdução de alimentos sólidos na dieta influencia na alteração no perfil de bandas representada pela menor similaridade entre as amostras desse período, bem como a utilização de antibiótico que também promove uma alteração temporária na microbiota. Ao final do primeiro ano de vida foi possível verificar a presença de bandas específicas de cada criança e o início da estabilização na colonização intestinal já nesse período de tempo.

A análise do dendrograma (Figura 2A) gerado pelo perfil de bandas do gel de DGGE da criança 1 mostrou as amostras separadas em três grupos principais. O primeiro grupo refere-se às amostras de 2 dias à 3 meses de vida, estando a amostra de 1 mês isolada. Nesse período a criança recebeu aleitamento materno exclusivo e introdução de chá com açúcar na alimentação no segundo mês. Observam-se poucas bandas nas amostras desse grupo. O segundo grupo corresponde às amostras de 5 a 11 meses. É possível observar um aumento no número de bandas em relação ao agrupamento anterior. E o terceiro grupo correspondente às amostras de 12 e 13 meses. A partir do quarto mês a criança 1 teve início ao aleitamento misto que se manteve até o décimo segundo mês (tabela 2). Nesse grupo é observado um maior compartilhamento de bandas em relação aos dois agrupamentos anteriormente descritos.

Os valores de distância entre as amostras da criança 1 variaram de 50 % a 85 % sob o coeficiente de Dice; método UPGMA. O dendrograma de similaridade do DGGE (Figura 2A) também mostra um aumento progressivo do número de bandas do primeiro ao terceiro grupos indicando o aumento da diversidade. A interação da distribuição das bandas em relação às amostras indica mudanças na composição da microbiota ao longo do tempo. A análise do dendrograma mostrou a presença de 30 bandas distintas nas amostras da criança 1. É possível observar que duas bandas estão presentes em todas as amostras, bandas 18 e 21. Essas bandas foram sequenciadas e o resultado indicou para a banda 18 um micro-organismo ainda não cultivado com 97 % de

similaridade e para a banda 21 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* com 94 % de similaridade, banda que aparece a partir da amostra de 7 dias. As bandas sequenciadas estão indicadas na figura 2A pelas setas.

No gráfico da AC é possível observar a distribuição das amostras e espécies/bandas ao longo dos dois eixos (22,8 % da variância para o eixo 1 e 16,6 % da variância para o eixo 2). No mesmo gráfico observa-se também o início da heterogeneidade entre as amostras a partir do terceiro até o décimo primeiro mês. Pode-se observar no gráfico da AC (Figura 2B) que as bandas 24 e 25 ocorrem preferencialmente na amostra de cinco meses, período seguinte à introdução de alimentos. A banda 25 foi recortada do gel e sequenciada (Figura 2A). O resultado do sequenciamento indicou 100 % de similaridade com *Bifidobacterium longum* subsp. l*ongum*.

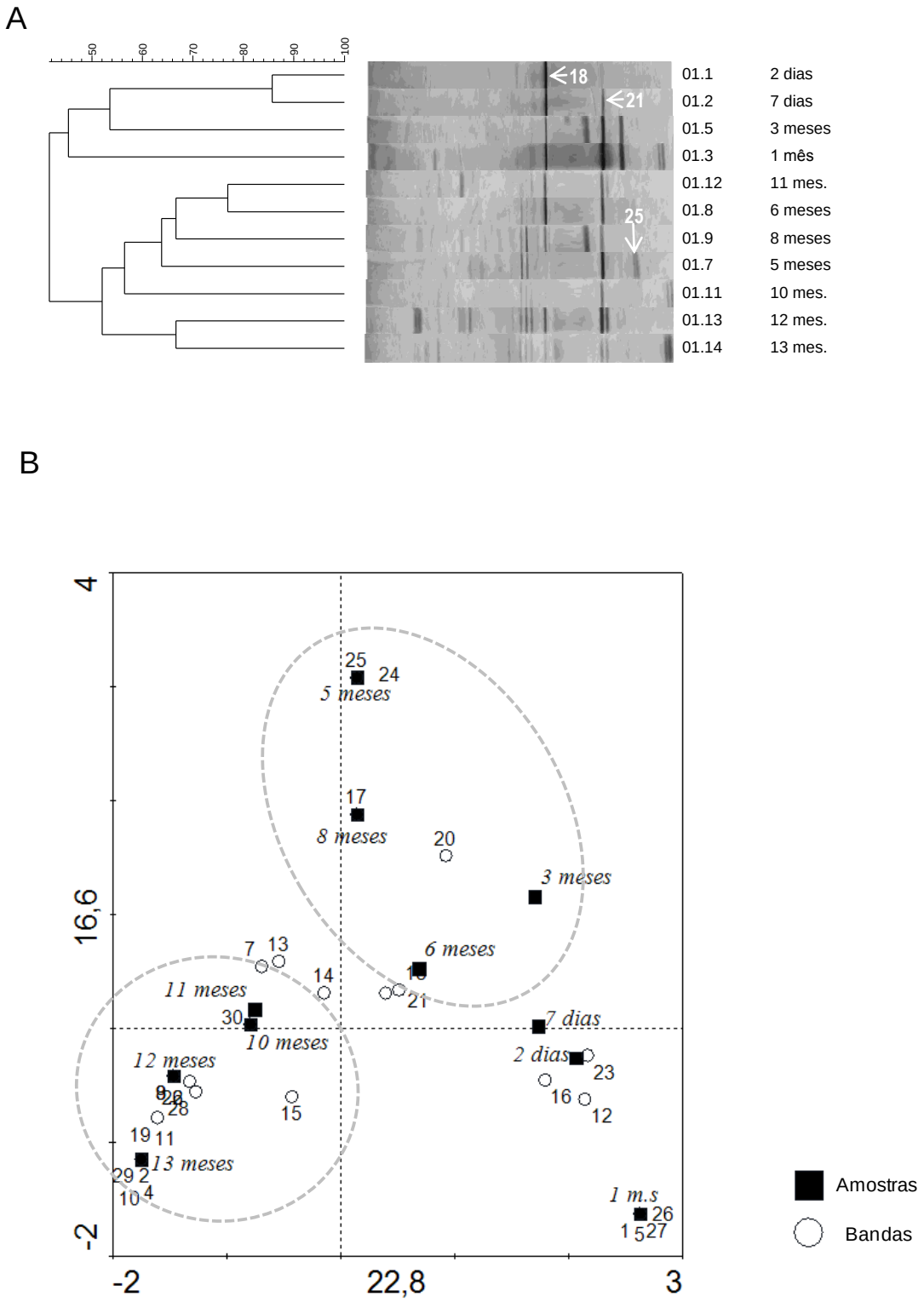


Figura 2 – A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 1. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 1.

O dendrograma de similaridade gerado pelo perfil de bandas do DGGE da criança 2 não mostrou uma sucessão temporal das amostras (Figura 3A). O histórico mensal dessa criança (tabela 2) aponta a introdução de aleitamento misto (aleitamento materno e aleitamento por leite formulado e por leite integral e água) logo no segundo mês de vida, sugerindo que essa alteração no aleitamento também pode estar relacionada a esse não agrupamento das amostras.

São observadas poucas bandas compartilhadas entre as amostras da criança 2. Esse compartilhamento é observado nas amostras mais inicias, de 2 dias a um mês de vida. Após esse período, observa-se um aumento no número de espécies/bandas, um menor compartilhamento destas entre as amostras temporais, além de alterações e flutuações constantes na composição da microbiota entre os meses analisados. Esses dados podem ser explicados pela heterogeneidade de alimentação que a criança foi exposta (tabela 2), não sendo possível uma correlação apenas com o aleitamento. Observa-se no dendrograma (Figura 3A) que a amostra de 13 meses está em um ramo isolado entre as amostras iniciais da criança 2. O histórico mensal aponta baixo ganho de peso no mês anterior à coleta dessa amostra (Tabela 2).

As amostras da criança 2 apresentaram um total de 46 bandas distintas. Foram sequenciadas duas bandas das amostras da criança 2. A banda 37 está presente nas amostras iniciais de 2, 7 dias e 1 mês de vida e o resultado do sequenciamento indicou uma similaridade de 97 % com *Bifidobacterium dentium*. A banda 44 surgiu primeiramente na amostra de 7 dias, desaparecendo após esse período e reaparecendo somente nas amostras mais tardias de 10 e 11 meses, o resultado do sequenciamento indicou a similaridade de 96 % com *Bifidobacterium* ainda não cultivado. As bandas estão indicadas por setas e números na figura 3A.

O perfil de bandas gerados pelo DGGE foi correlacionado com as amostras temporais da criança 2 na análise de correspondência (Figura 3B). Diferentemente do cluster gerado a AC mostrou as amostras temporais separadas em dois grupos distribuídos em relação ao primeiro eixo (25,5 % da explicação da variância), separando as amostras de 2 dias até 1 mês das

amostras de 4 a 13 meses. O segundo eixo explicou 19,8 % da variância. Embora as amostras da criança 2 apresentassem um perfil de bandas bastante heterogêneo, a AC sugerindo o início da estabilização da microbiota intestinal no final do 1° ano de vida. Esse fato pode ser observado pela maior interação e compartilhamento de bandas ente as amostras de 11 a 13 meses (figura 3B).

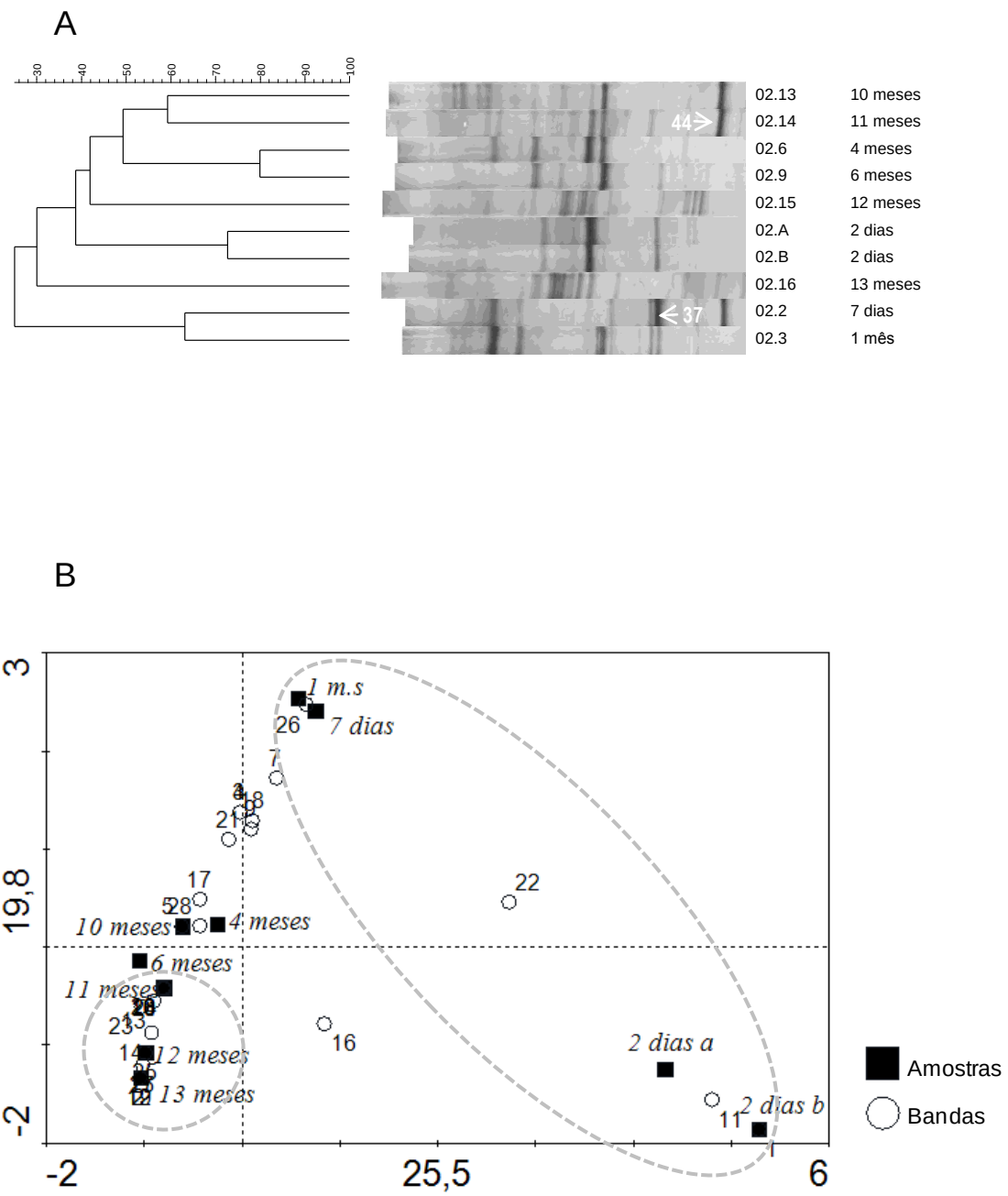


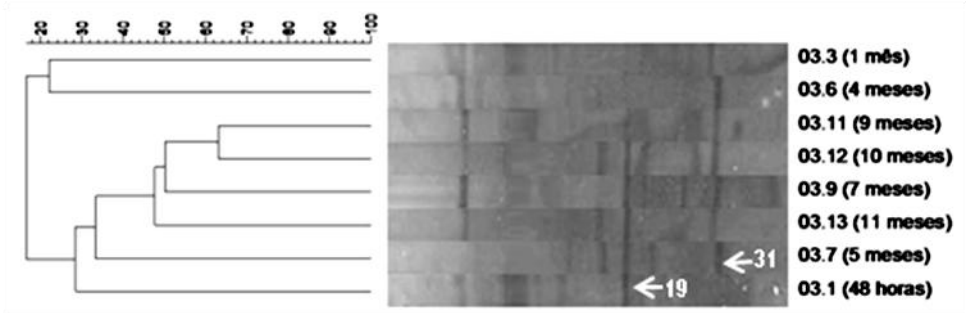
Figura 3 – A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 2. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 2.

A análise do dendrograma gerado a partir do perfil de bandas obtido do DGGE das amostras da criança 3 mostra um agrupamento principal que compreende as amostras de 4 a 11 meses. E as amostras de 2 dias e 1 mês aparecem isoladas (Figura 4A). A partir dos 6 meses de vida a criança 3 passa a receber aleitamento misto e introdução de alimentos sólidos na dieta, período em que há um aumento na variedade de bandas nas amostras.

O gráfico da AC das amostras da criança 3 (Figura 4B) mostra uma maior similaridade entre as amostras de 2 dias a 4 meses, mais próximas entre si. As amostra a partir de 5 meses se mostram mais distantes umas das outras, pois apresentam-se dispersas ao longo dos eixo 1 (32,7 % da variância) e eixo 2 (23,2% da variância). O histórico mensal da criança 3 aponta que ela utilizou antibiótico no sétimo dia de vida (amostra não coletada) para tratamento de impedigo (Tabela 2), mas não se pode observar uma alteração significativa dessa amostra em relação às outras apenas com a análise do gráfico de AC. Ainda na AC é possível observar que as espécies/bandas são pouco compartilhadas entre as amostras de 2 dias a 4 meses. A partir da amostra de 5 meses é possível observar um aumento na variedade de bandas e um maior compartilhamento de bandas comuns entre as amostras de 10 e 11 meses. O que pode indicar o início da estabilização da microbiota.

A análise do dendrograma da criança 3 apresentou um total de 32 bandas presentes nas amostras. Foram sequenciadas duas bandas da criança 3. A banda 19, que aparece inicialmente na amostra de 1 mês e permanece presente em todas as amostras a partir desse período com exceção da amostra de 4 meses, indicou similaridade de 100 % com micro-organismo ainda não cultivado. A outra banda sequenciada foi a banda 31 que apareceu inicialmente na amostra de 1 mês de vida. O resultado do sequenciamento indicou 92 % de similaridade com *Bifidobacterium* não cultivado. As bandas sequenciadas estão indicadas pelas setas e números na figura 4A.

A



B

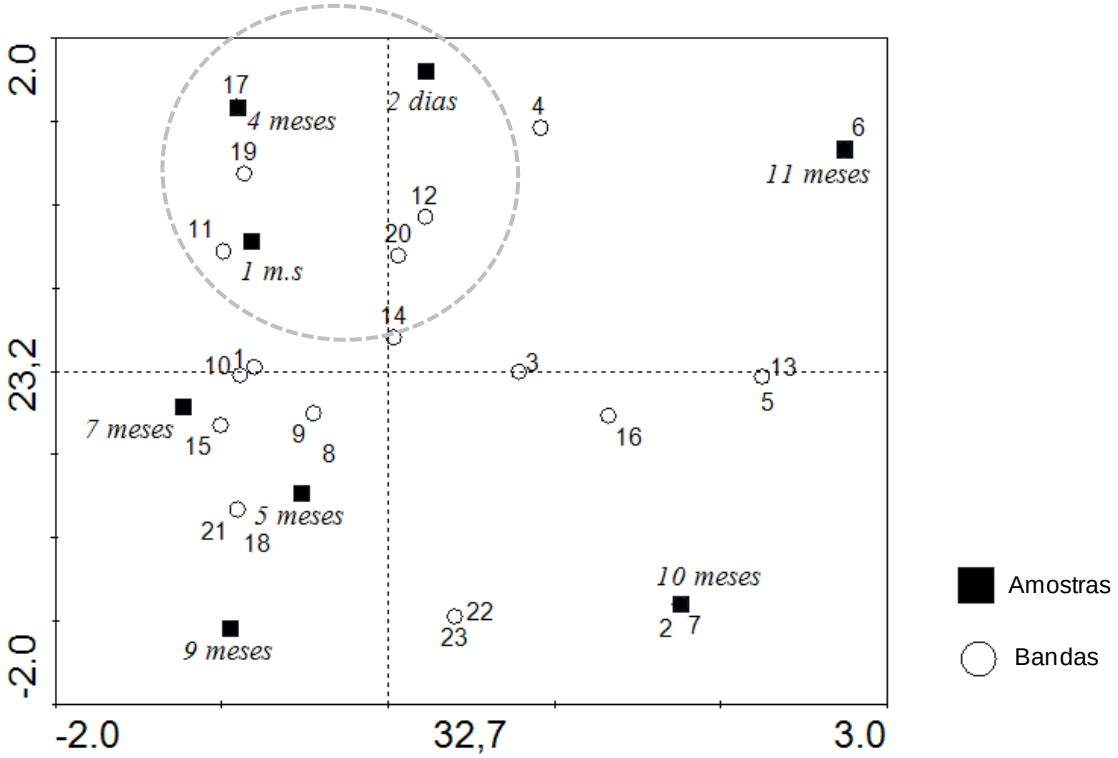


Figura 4 - A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 3. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 3.

O dendrograma de similaridade gerado pelo perfil de bandas no DGGE das amostras da criança 6 mostra essas amostras divididas em três grupos (Figura 5A). O primeiro grupo refere-se a amostra de 7 dias, o segundo grupo corresponde às amostras de 3 e 5 meses e o terceiro grupo compreende as amostras de 8, 9 e 10 meses. Esse dendrograma mostra uma alteração na composição da microbiota ao longo dos meses e um grande aumento no número de bandas a partir do quinto mês, período em que aconteceu o desmame da criança 6 (Tabela 2). De acordo com o histórico mensal foi no quarto mês que se teve a introdução de alimentação sólida diversificada na dieta dessa criança (Tabela 2), o que pode ter influenciado esse grande aumento do número de bandas. A partir da amostra de 8 meses é possível observar uma maior similaridade nos perfis de bandas dessas amostras.

Tanto pelo dendrograma quanto pela AC (figura 5A e 5B) é possível observar o compartilhamento de bandas entre as amostras dessa criança. A AC mostra as amostras da criança 6 separadas em dois grupos em relação ao eixo 1 que representa 34,5 % da variância. O eixo 2 representa 28,4 % da variância. Pode-se observar um primeiro grupo contendo as amostras de 7 dias, 3 e 5 meses bastante heterogêneo entre si e um menor número de bandas compartilhadas. E um segundo grupo das amostras de 8, 9 e 10 meses, mais semelhantes entre si e com um compartilhamento das bandas maior indicando uma maior relação entre essas amostras e também o início da estabilização na composição da microbiota.

Ainda em relação ao primeiro grupo observado sobre o eixo 1 podemos ver que as amostras de 7 dias e 3 meses compartilham mais bandas entre si do que quando comparadas à amostra de 5 meses. Mesmo na falta da amostra de 4 meses para análise podemos sugerir que o evento de introdução de alimento sólido nesse período provocou uma grande alteração na composição da microbiota já no mês seguinte, 5 meses, pois vemos tanto no dendrograma quanto na AC o aumento do número de bandas e muitas bandas amostra específicas. No sétimo mês a criança fez uso de antibiótico (Tabela 2). Pode-se observar na amostra seguinte a esse episódio, amostra de 8 meses, uma clara diminuição no número de bandas em relação às outras amostras.

A análise do dendrograma (Figura 5A) da criança 6 mostrou um total de 35 bandas distintas. Para a criança 6 foram sequenciadas 3 bandas. A banda 8 que está presente nas amostras mais tardias, como 9 e 10 meses de vida. A banda 18 que está presente em todas as amostras e a banda 27 que está presente preferencialmente na amostra de 5 meses. O resultado do sequenciamento indicou 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado para a banda 8, 100 % de similaridade com *Escherichia* sp. para a banda 18 e 99 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado para a banda 27. As bandas sequenciadas estão indicadas pelas setas (Figura 5A).

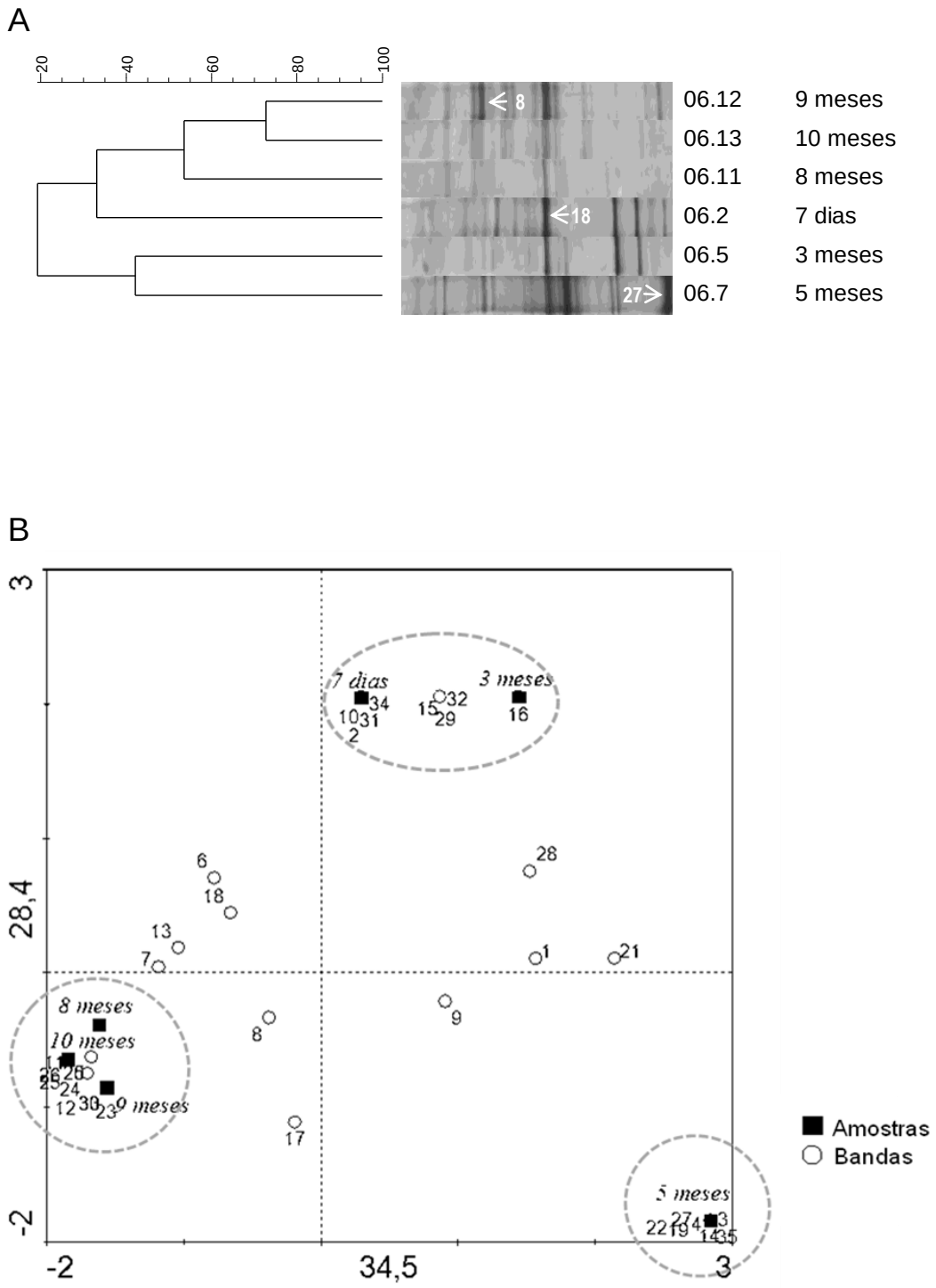


Figura 5- A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 6. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 6.

Foi possível verificar através do dendrograma (Figuara 6A) gerado a partir do perfil de bandas do DGGE da criança 7 que suas amostras temporais apresentam-se predominantemente divididas em dois grandes grupos. Um grupo das amostras de 7 dias a 4 meses e um segundo grupo de 8 meses a um ano de vida. O primeiro grupo apresenta uma menor similaridade das amostras do que em relação ao segundo grupo. É possível também observar pelo dendrograma que a amostra de 2 dias apresenta um perfil com menor número de bandas que a separa das demais no agrupamento.

O histórico da criança 7 (tabela 2) apontou introdução de aleitamento com fórmulas artificiais a partir do terceiro mês de vida e aleitamento com leite fluido a partir do oitavo mês. A introdução de alimentação sólida na dieta ocorreu no quinto mês. Não apresentando nenhum quadro de intercorrências durante o período estudado. E ao final de um ano o ganho de peso dessa criança foi normal.

A AC (Figura 6B) mostrou grande número de bandas nas amostras iniciais da criança 7 (amostras de 2 dias a 4 meses), bem como uma maior compartilhamento destas entre as essas amostras. É possível observar que essas amostras se encontram distribuídas ao longo do lado esquerdo do eixo 1 (25,8 % da variância) enquanto as amostras de 8 meses a 1 ano de vida (tardias) se encontram ao lado direito do eixo 1. A amostra de 8 meses se encontra localizada do lado oposto as amostras de 10 meses a 1 ano em relação ao eixo 2 (18,6 % da variância). A análise das amostras intermediárias (5 meses, início da introdução de alimento sólidos na dieta, 6 e 7 meses) ficou prejudicada devido a não coleta das amostras desse período pela mãe da criança.

Tanto o dendrograma quanto a AC mostraram que ao longo da colonização intestinal da criança 7 houve uma diminuição no número de bandas, sendo estas maiores no início da colonização.

A análise de similaridade (Figura 6A) mostrou um total de 30 bandas nas amostras da criança 7. Foi sequenciada a banda 16 que apareceu inicialmente na amostra de 7 dias e permanece presente em todas as amostras dos períodos seguintes. O resultado do sequenciamento indicou 100 % de

similaridade com micro-organismo ainda não cultivado. A banda está indicada na figura 6A pela seta.

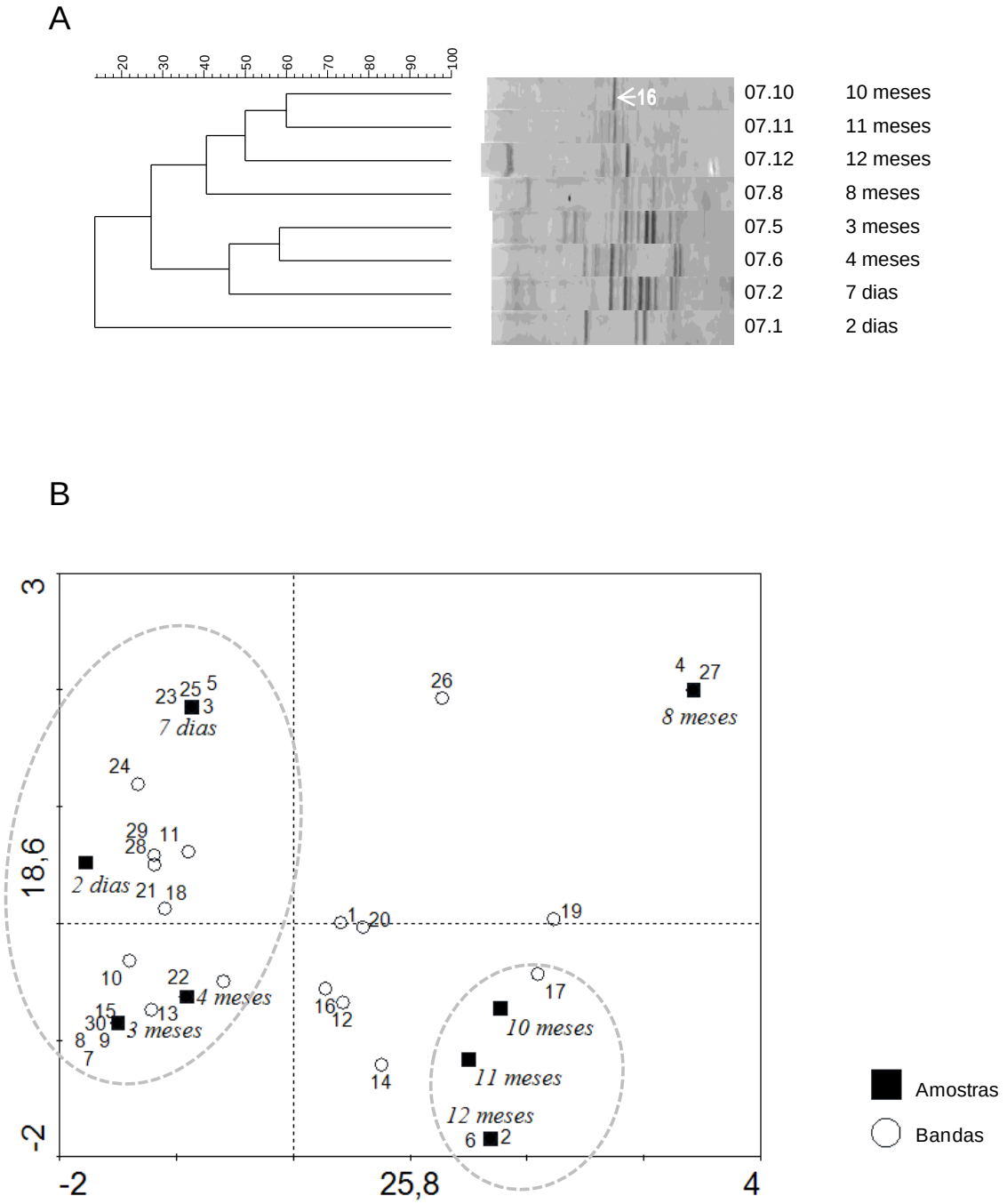


Figura 6 - A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 7. Método UPGMA, coeficiente de Dice. A seta indica a banda sequenciada. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 7.

As análises das amostras da criança 8 foram feitas a partir do segundo mês de vida, pois não foram realizadas as coletas das amostras iniciais dessa criança, amostras de 2 dias até 1 mês de vida. Pela análise do dendrograma (Figura 7A) é possível observar apenas um agrupamento das amostras de 11 e 12 meses de vida que apresentam 75 % de similaridade. As outras amostras não apresentam similaridade nem agrupamentos evidentes. Ainda no dendrograma vemos que ocorre uma alteração muito relevante do número de bandas de uma coleta para a coleta seguinte e que somente nas duas amostras finais (11 e 12 meses) pode-se observar o início da estabilização na composição da microbiota. O histórico mensal da criança 8 (tabela 2) aponta que já no segundo mês de vida, período em que foi coletada a primeira amostra da análise, a criança recebeu aleitamento misto com leite em pó e engrossante. E no mês seguinte, terceiro mês de vida a criança recebeu a introdução precoce de frutas na dieta. Durante o período de estudo essa criança teve quatro episódios de diarréia, dois episódios de resfriado e fez uso de antibiótico (amoxacilina) por duas vezes, uma no quinto mês e outra no décimo primeiro mês de vida. Pode-se notar o desaparecimento de bandas nos meses seguintes à utilização do antibiótico.

A AC (Figura 7B) assim como o dendrograma também mostra que as amostras finais de 11 e 12 meses estão muito relacionadas entre si do que em relação às demais amostras que. Mas é possível observar que as amostras de 2 e 3 meses estão bem relacionadas entre si e que a partir desse período quando a criança 8 recebeu alimentação sólida (frutas) houve uma mudança no perfil da microbiota indicada pela maior distância da amostra do período seguinte. Assim como no dendrograma a AC mostra as amostras de 8 e 9 meses pouco relacionadas entre si. Tanto o dendrograma quanto a AC mostram que há um compartilhamento de bandas entre as amostras de 2, 3 e 8 meses. O gráfico da AC mostrou que o eixo 1 contribuiu com 32,2% da variância e o eixo 2 contribuiu com 20,7%.

O histórico mensal dessa criança (tabela 2) também apontou as precárias noções de higiene da mãe e as condições de moradia da família, onde cinco pessoas habitam um único cômodo sem janela e com alta umidade.

Fatores como aleitamento misto logo no segundo mês de vida, introdução de alimentos sólidos no terceiro mês, quadros recorrentes de diarreia e as noções de higiene precárias contribuíram para a instabilidade durante o processo de colonização da microbiota intestinal dessa criança.

A análise do dendrograma da criança 8 (Figura 7A) mostrou um total de 17 bandas. A banda 7 foi analisada por sequenciamento e indicou 98 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado. Essa banda apareceu inicialmente na amostra de 9 meses e permaneceu nas amostras dos períodos seguintes. A banda está indicada na figura 7A pela seta.

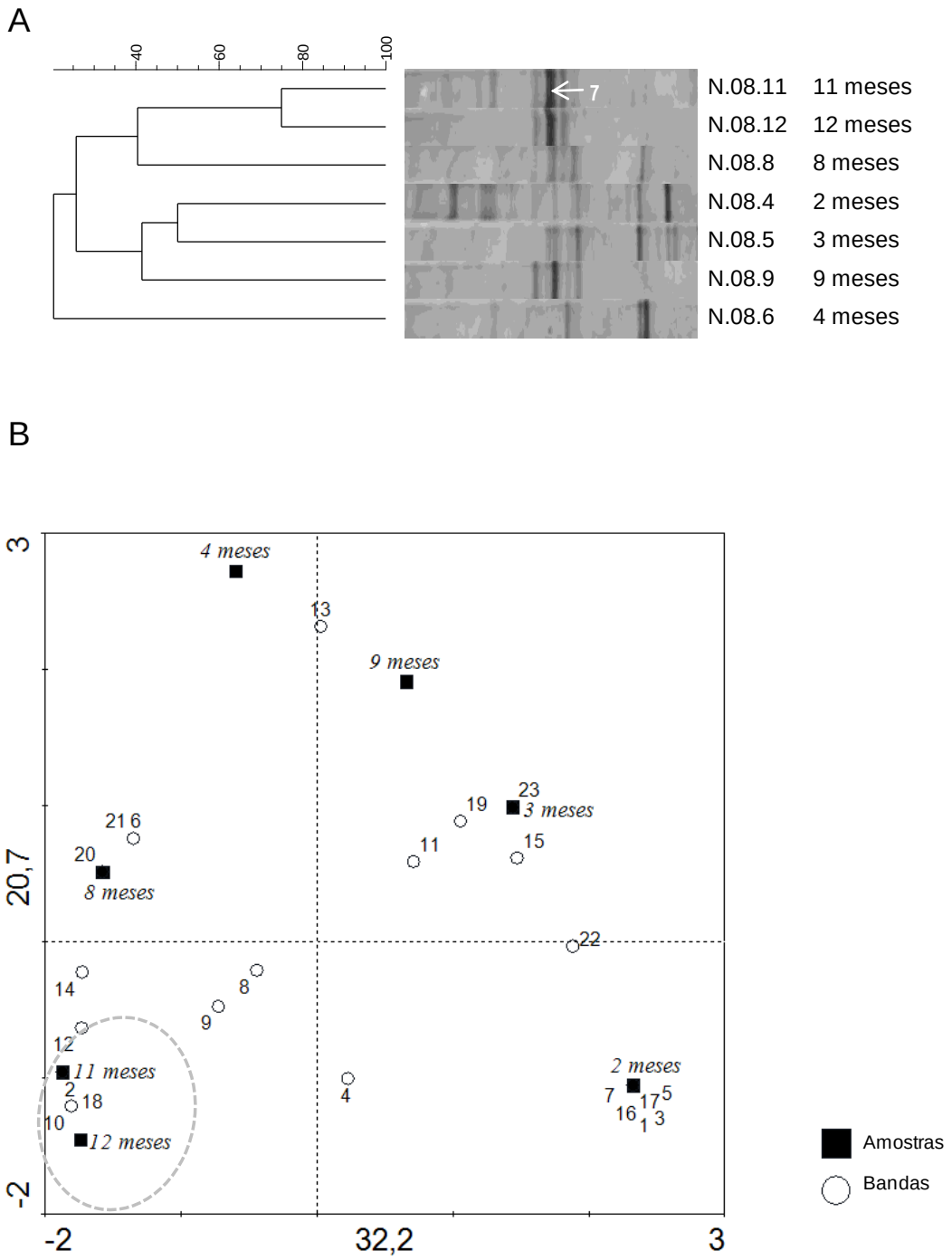


Figura 7 - A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 8. Método UPGMA, coeficiente de Dice. A seta indica a banda sequenciada. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 8.

O dendrograma gerado a partir dos perfis de bandas do DGGE da criança 12 (Figura 8A) mostrou que as amostras temporais dessa criança estão divididas em três grupos. O primeiro grupo das amostras do início da colonização (2 e 7 dias, 1 e 2 meses de vida), o segundo grupo compreende as amostras do período intermediário (7, 8, 9 e 10 meses de vida) e o terceiro grupo das amostras tardias (a partir de 12 meses de vida). Podemos observar que o número de bandas das amostras do primeiro grupo se diferencia do número de bandas das amostras dos dois outros grupos. O histórico mensal da criança 12 aponta que essa criança recebeu aleitamento materno exclusivo até o quarto mês e teve início a alimentação no sétimo mês (tabela 2) e de acordo com essas alterações podemos notar que no primeiro grupo (2 dias, 7 dias, 1 e 2 meses) há um compartilhamento de uma banda que desaparece nos outros dois grupos, essa banda é representada pelo número 17 no dendrograma (Figura 8A), e que a partir do sétimo mês se tem o aparecimento de uma nova banda compartilhada entre as amostras coletadas até o final do estudo (banda 7 no dendrograma, figura 8A). O histórico também aponta que quando a criança teve início ao aleitamento misto apresentou quadro de diarreia durante dois meses, mas que não puderam ser analisados devido ao fato de que não foram coletadas amostras nesses períodos.

A análise de similaridade das amostras da criança 12 mostrou um total de 17 bandas. As bandas 7 e 17 foram sequenciadas. O resultado da análise do sequenciamento indicou 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado para a banda 7 e de 99 % de similaridade com *Bifidobacterium* ainda não cultivado para a banda 17. As bandas estão indicadas pelas setas e números no dendrograma (Figura 8A).

A AC (Figura 8B) também mostra as amostras da criança 12 separadas em três grupos refletindo o mesmo resultado do dendrograma. É possível notar a separação do terceiro grupo, representado pelas amostras a partir de 12 meses de vida em relação aos dois outros grupos sobre o eixo 1, que representa 32,1 % da variância. Analisando a distribuição das bandas em relação às amostras podemos ver que tanto no primeiro grupo quanto no terceiro há um conjunto de bandas amostras específicas em cada um desses

grupos e já na análise da distribuição de bandas no segundo grupo pode-se ver que há um maior compartilhamento de bandas. Esse compartilhamento se dá tanto com o primeiro quanto com o terceiro grupos.

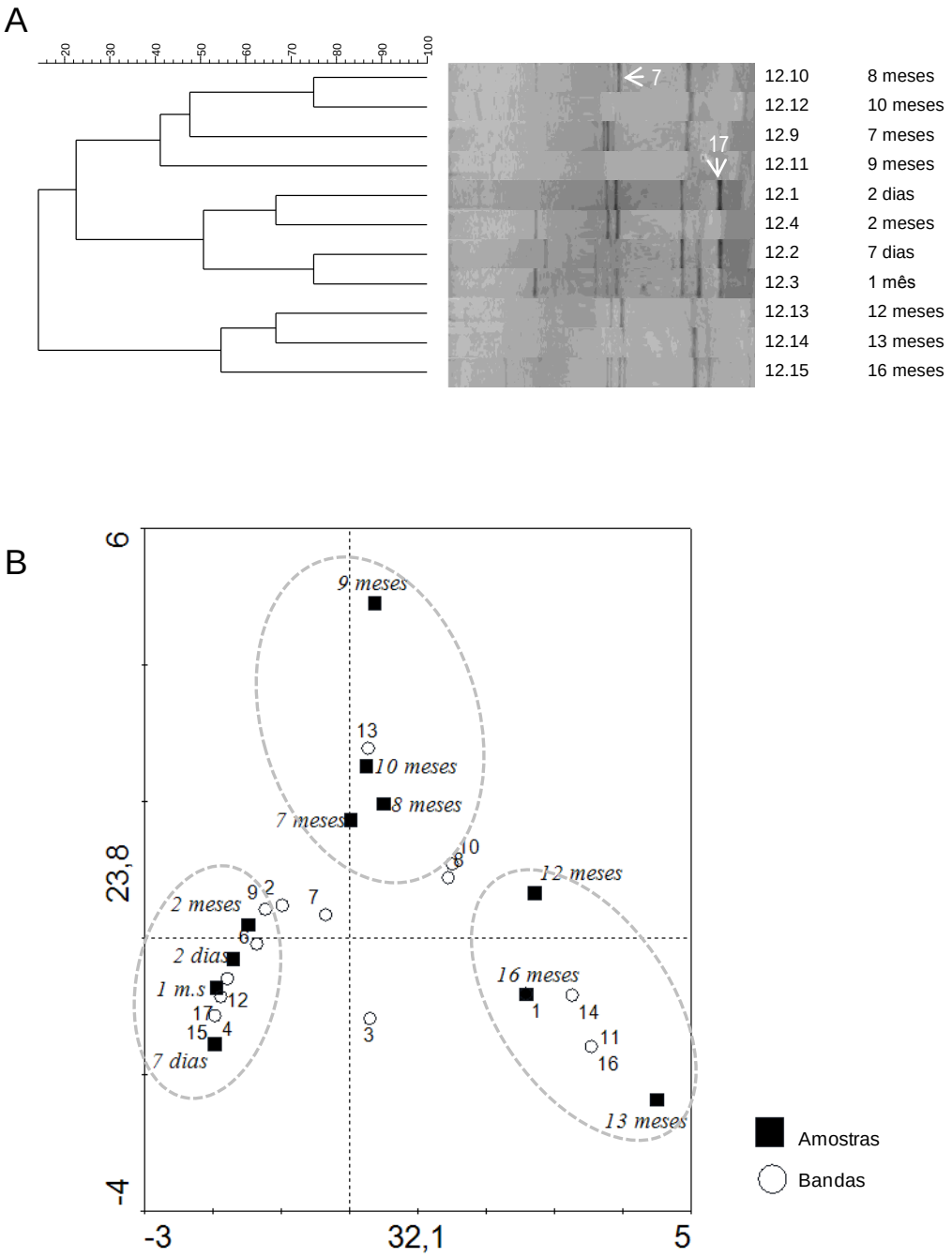


Figura 8 - A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 12. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança12.

O histórico mensal (tabela 2) da criança 13 aponta que a criança recebeu aleitamento materno exclusivo até o quinto mês de vida e que a partir desse período teve início da alimentação primeiramente com caldo de feijão e no mês seguinte alimentos sólidos e aleitamento misto. Ao longo do período de estudo a criança não apresentou quadros de intercorrências clínicas, não fez uso de antimicrobianos, a mãe se mostrou atenciosa nos cuidados com a criança que ao final do período de estudo apresentou bom ganho de peso. As amostras analisadas dessa criança compreendem principalmente o período após a introdução de alimentos sólidos e aleitamento misto, já que as amostras iniciais não foram coletadas pela mãe, deste modo ao se analisar o dendrograma (Figura 9A) gerado a partir do perfil de bandas dessas amostras observa-se um grande grupo heterogêneo das mesmas e as amostras de 7 dias de vida, 12 meses e 16 meses isoladas.

A análise do dendrograma (Figura 9A) mostra um total de 25 bandas para as amostras da criança 13. Nas análises tanto do dendrograma quanto da AC (Figura 9A e 9B) podemos ver que há um compartilhamento de bandas entre as amostras de 7 dias a 11 meses (bandas 4 e 20). As amostras tardias, de 12 e 16 meses, tem poucas bandas compartilhadas entre si. Já a banda 14 é compartilhada em quase todas as amostras, com exceção da amostra de 7 dias. Pode-se observar também um menor número de bandas presentes na amostra de 2 dias em relação às demais amostras que se seguem a esse período. Apesar do baixo compartilhamento de bandas das amostras tardias é possível observar que a banda 2 (indicada pela seta na Figura 9A) aparece nas amostras de 9, 10 e 11 meses desaparece na amostra de 12 meses reaparecendo depois na amostra de 16 meses. Pela AC é possível observar que as amostras isoladas (7 dias, 12 e 16 meses) apresentam bandas amostras específicas. Ainda com relação a AC vemos a distribuição de bandas e amostras ao longo dos dois eixos do gráfico, onde o eixo 1 representa 25,4 % na explicação da variância e o eixo 2 representa 21,8 %.

As bandas 4 e 14 da criança 13 foram sequenciadas e os resultados indicaram 98 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado para a banda 4 e 99 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado

para a banda 14. As bandas estão indicadas no dendrograma pelas setas e números (Figura 9A).

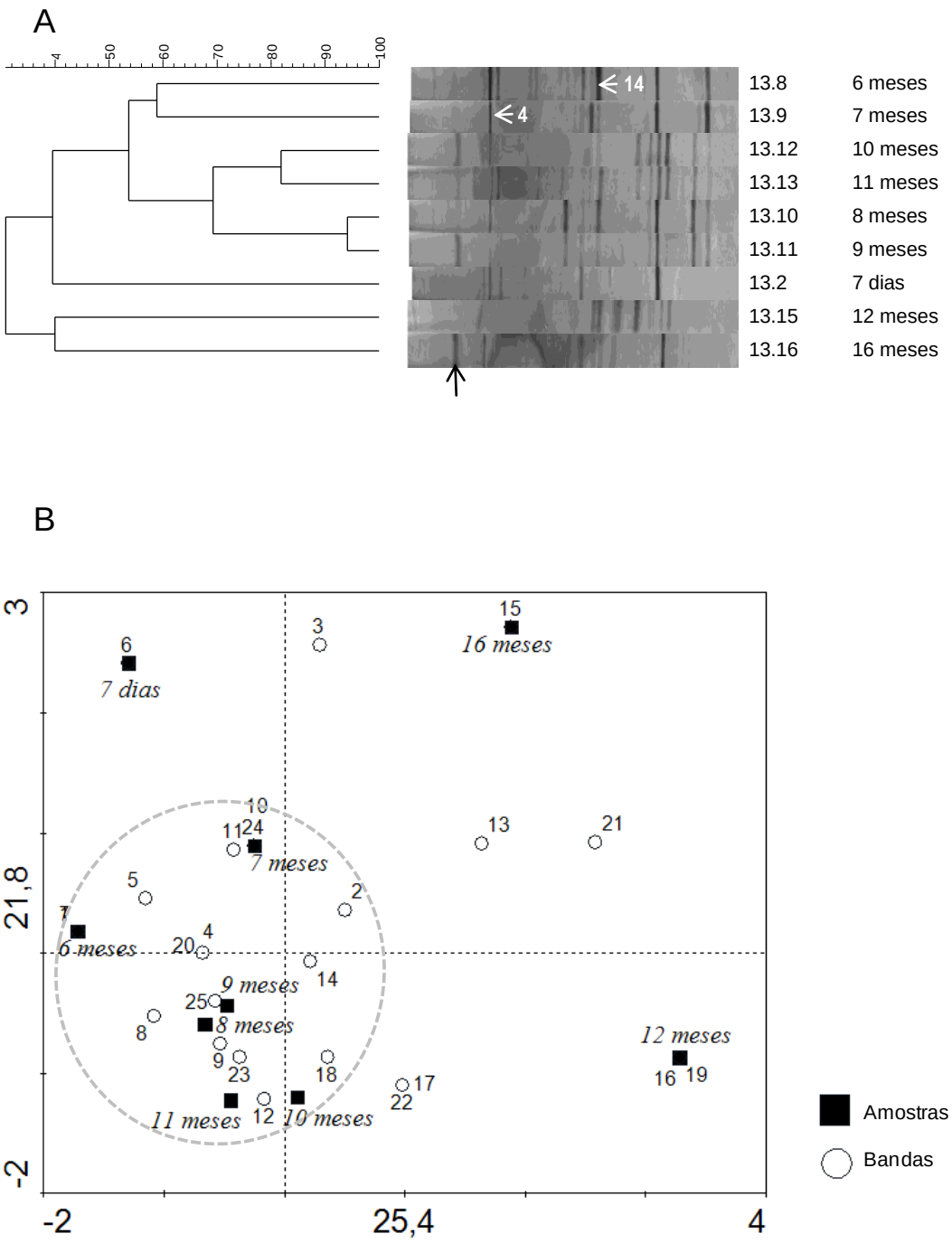


Figura 9 - A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 13. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 13.

A análise do dendrograma da criança 14 (Figura 10A) mostra as amostras separadas em dois grupos, um das amostras de 3 meses a sete meses e outro das amostras de 8 meses a 12 meses, com exceção da amostra de 11 meses que se separa das demais amostras no agrupamento. As amostras iniciais (2 dias, 7 dias e 1 mês de vida) embora separadas das demais não formam um grupo devido a baixa similaridade entre elas representada no dendrograma (em torno de 20 % de similaridade), mas na análise dessas amostras é possível notar a sucessão ecológica na colonização da microbiota nesse período devido ao aumento progressivo no número de bandas nos perfis dessas amostras.

O histórico mensal da criança 14 aponta que a criança recebeu aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida. No período seguinte, sétimo mês, teve início a aleitamento misto e alimentos sólidos. Pode-se observar o reflexo do histórico da criança no perfil da sua comunidade microbiana, pois o período em que recebeu somente aleitamento materno corresponde a um determinado perfil de bandas e quando se tem a introdução de alimento sólido há uma nítida alteração nos perfil de bandas das amostras. Observa-se no gráfico da AC que após essas alterações houve um aumento no número de bandas nas amostras dessa criança (Figura 10B). O histórico também informa sobre o uso de antifúngico no quinto mês e antibiótico no nono mês que coincidem com o subsequente desaparecimento da banda 2 (indicado no dendrograma pela seta) que reaparece após certo período sem o uso dos medicamentos (9 meses e 12 meses) .

A análise de similaridade das amostras da criança 14 mostrou um total de 35 bandas distintas. Foram sequenciadas quatro bandas das amostras dessa criança. O resultado do sequenciamento indicou 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado para a banda 18, 99 % de similaridade com *Klebsiella* ainda não cultivada para a banda 19, 87 % de similaridade com *Bifidobacterium* ainda não cultivado para a banda 27 e 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado para a banda 34. As bandas estão indicadas no dendrograma pelas setas e números (Figura 10A).

Tanto pela análise do dendrograma quanto pela AC é possível observar o compartilhamento de bandas durante todo o período estudado. E também a distribuição de bandas e amostras ao longo dos dois eixos do gráfico, onde o eixo 1 contribui com 15,9 % na explicação da variância e o eixo 2 com 14,9 %.

Na AC vemos as amostras separadas em dois grupos, um das amostras de 5 a 7 meses bem homogêneo e outro das amostras de 8 meses a 12 meses mais heterogêneo. As amostras iniciais (2 dias a 3 meses) se apresentam bem dispersas no gráfico com poucas bandas compartilhadas e com mais bandas amostras específicas em relação aos outros dois grupos.

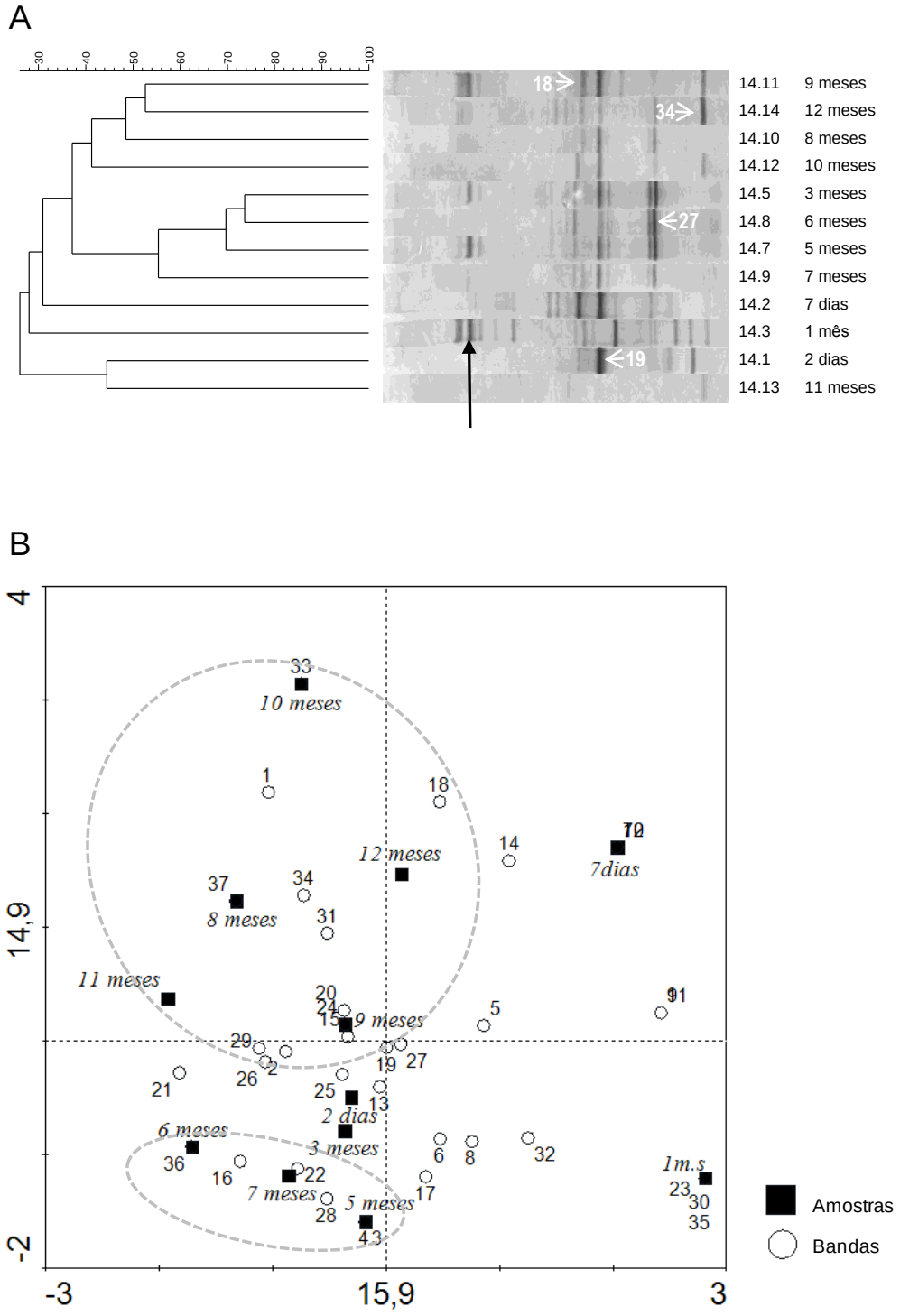


Figura 10 - A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 14. Método UPGMA, coeficiente de Dice. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 14.

A análise do dendrograma da criança 15 (Figura 11A) mostra as amostras separadas em três grupos. Um grupo da amostras iniciais de 2 dias e 7 dias com um menor número de bandas em relação às demais amostras, um segundo grupo das amostras de 1, 2 e 5 meses e um terceiro grupo mais heterogêneo das amostras mais tardias (7 meses a 14 meses). É possível observar o aumento sucessivo do número de bandas ao longo dos meses analisados. Pode-se ver também que existe um compartilhamento de bandas bem como flutuações de algumas delas, como por exemplo, a primeira banda na amostra de 1 mês (banda 1) que desaparece no mês seguinte reaparecendo no quinto mês e a especificidade de algumas bandas em amostras determinadas, como a segunda banda que aparece somente nas amostras de 1 e 2 meses (banda 2). O histórico mensal da criança 15 mostrou que a criança teve ao longo do primeiro ano de vida sete quadros de internações por epilepsia grave. Esse fato pode estar relacionado às alterações evidentes na composição da microbiota (diversidade) observadas de uma coleta para a seguinte, o que pode ser notado tanto no dendrograma quanto no gráfico da AC. O histórico aponta que a criança 15 recebeu aleitamento materno até o terceiro mês de vida, aleitamento misto do terceiro mês ao sexto mês e após o nono mês de vida recebeu aleitamento somente com leite fluido.

O dendrograma de similaridade das amostras da criança 15 (Figura 11A) mostrou um total de 25 bandas. Foram sequenciadas três bandas das amostras da criança 15, bandas 2, 8 e 24. O resultado do sequenciamento indicou 99 % de similaridade com *Lactobacillus gasseri* para a banda 2, 98 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado para a banda 8 e 98 % de similaridade com *Bifidobacterium longum* subsp *longum* para a banda 24. As bandas estão indicadas no dendrograma (Figura 11A) pelas setas e números.

Na AC (Figura 11B) podemos ver as amostras separadas em relação ao eixo 1, que corresponde a 26,0 % da explicação da variância. Pode-se observar que as amostras de 2 dias até 5 meses estão localizadas à esquerda do eixo 1 e as amostras coletadas após esse período e que coincidem com a introdução de alimentos sólidos na dieta estão localizadas à direita do mesmo

eixo. O eixo 2 contribui com 16,0 % na explicação da variância. Ainda com relação a AC observa-se o compartilhamento de algumas bandas entre as amostras e também algumas bandas que são amostras específicas, ou seja, que ocorrem preferencialmente em determinado grupo de amostras. E do mesmo modo que no dendrograma podemos ver as amostras separadas em três grupos, um grupo das amostras de 2 e 7 dias mais relacionado entre si e com compartilhamento das bandas específicas a esse grupo, um segundo grupo das amostras de 1, 2, e 5 meses e o terceiro grupo bem heterogêneo com grande compartilhamento e flutuações de bandas entre as amostras.

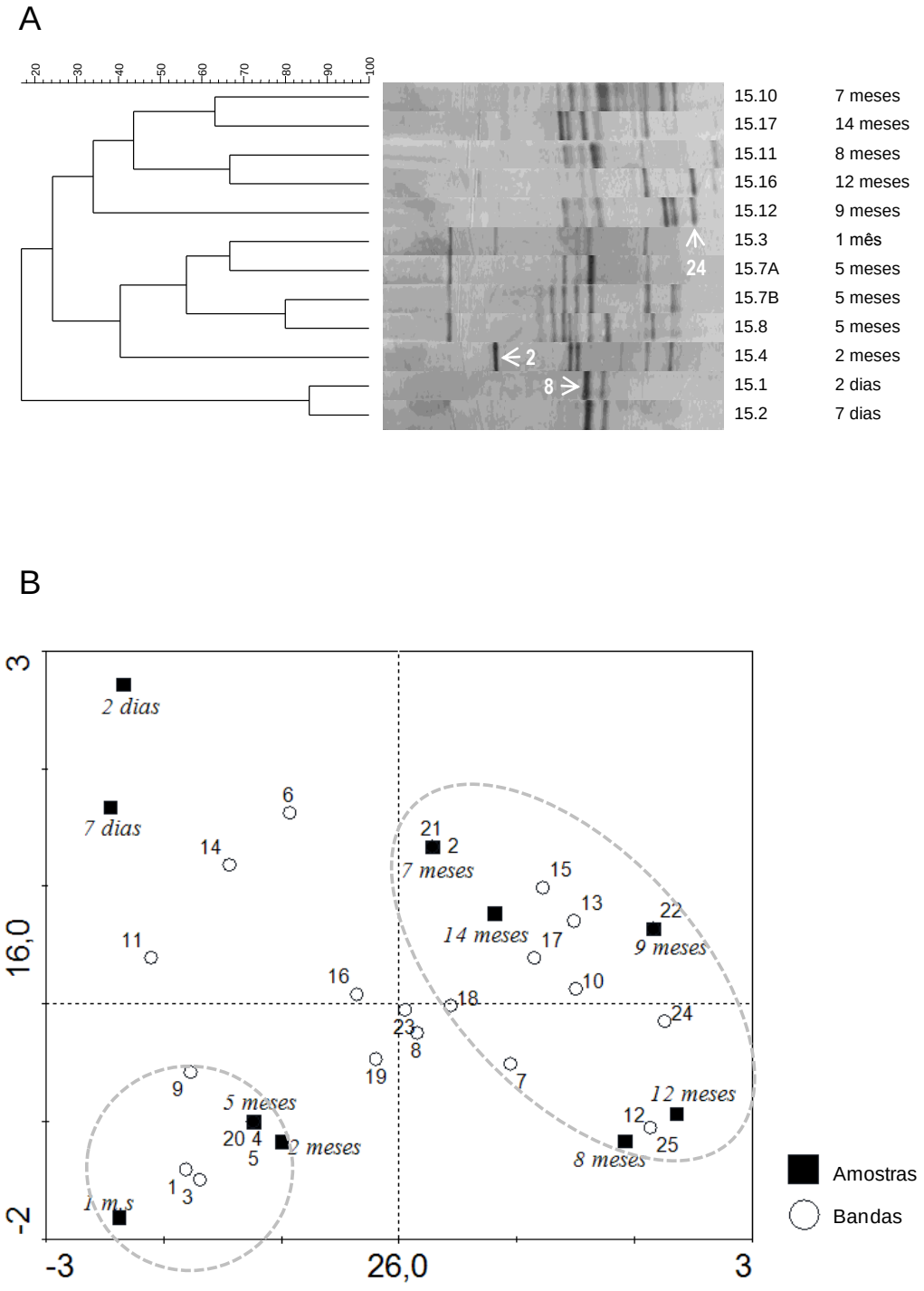


Figura 11 - A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 15. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 15.

O dendrograma gerado a partir dos perfis de bandas do DGGE da criança 17 (Figura 12A) mostrou que a amostra inicial de 2 dias apresentou somente duas bandas e ficou separada do agrupamento, deste modo optou-se por retirá-la das análises de agrupamento e AC para uma melhor avaliação das relações entre bandas e amostras. O dendrograma obtido após a retirada da amostra de 2 dias (Figura 13A) mostrou o mesmo agrupamento dos perfis de bandas obtido anteriormente, já na AC foi possível uma melhor visualização da distribuição entre amostras e bandas no gráfico.

A

B

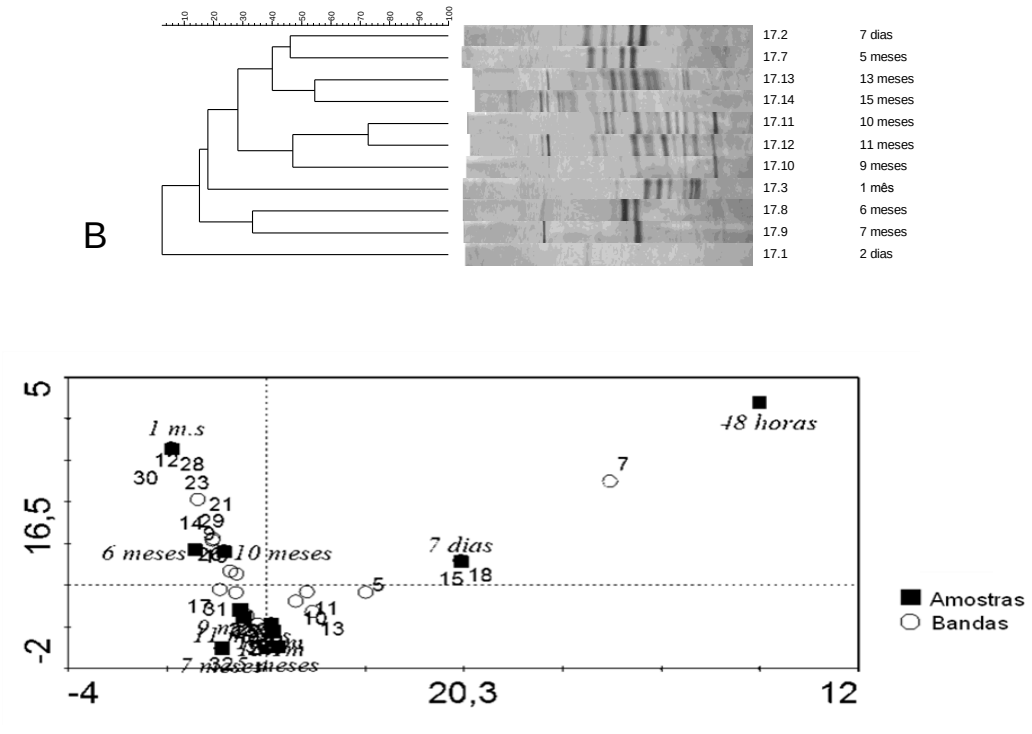


Figura 12 - A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 17. Método UPGMA, coeficiente de Dice. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 17.

A análise dos perfis de bandas da criança 17 gerados pelo PCR-DGGE gerou um dendrograma com poucos agrupamentos evidentes (Figura 13A). É possível observar que as amostras de 6 e 7 meses estão mais separadas das outras amostras devido a um menor número de bandas presentes nessas duas amostras. O histórico mensal dessa criança mostra que nesse período a criança 17 fez uso de antibiótico (6 meses) para tratamento de otite e uso de antialérgico (7 meses) para tratamento de urticária. O histórico também aponta que essa criança recebeu aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida e a partir do sétimo mês teve início a alimentos sólidos na dieta. Ainda com relação ao dendrograma podemos ver o compartilhamento de muitas bandas entre as amostras dessa criança e também a flutuação de bandas durante o período estudado como a banda 24 que aparece nas amostras a partir de 5 meses (indicada na Figura 13A). Essa banda foi cortada do gel e sequenciada.

No gráfico da AC (Figura 13B), o eixo 1 representa 21,1 % da explicação da variância dos dados e o eixo 2 17,5 %. A análise do gráfico mostra que as amostras de 7 dias, 1 mês e 7 meses estão separadas das demais e também a ocorrência preferencial de bandas amostra específicas. As demais amostras estão distribuídas em relação ao eixo 1 do gráfico, mas muito próximas da origem. Desse modo podemos inferir que essas amostras compartilham a maioria das bandas em seus perfis e se apresentam muito semelhantes e inter-relacionadas. Do mesmo modo que o dendrograma a AC mostrou que a amostra de 7 meses, período que seguiu a utilização de antibiótico, está separada das demais amostras localizadas próximas à origem do gráfico.

A análise de similaridade das amostras da criança 17 mostrou um total de 32 bandas. Foram sequenciadas 4 bandas das amostras da criança 17. O resultado do sequenciamento indicou 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado para a banda 4, 100 % de similaridade com *E. coli* clone KC030 para a banda 24, 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado para a banda 25 e 100 % de similaridade com *Bifidobacterium pseudocatenulatum* para a banda 31. As bandas estão indicadas pelas setas e números no dendrograma (Figura 13A).

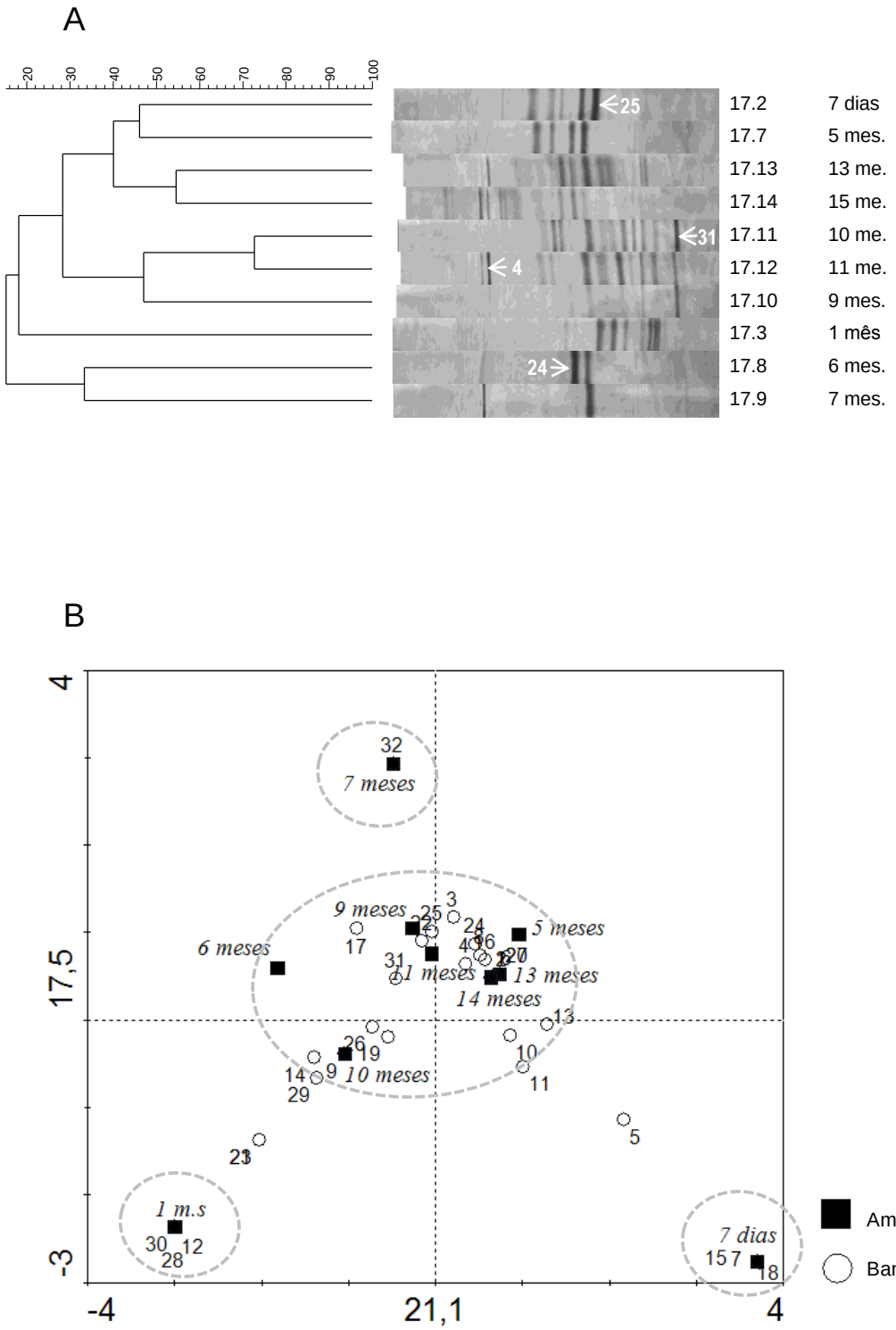


Figura 13 - Criança 17 sem amostra de 2 dias, A. Dendrograma de similaridade gerado do perfil de PCR-DGGE obtido a partir das amostras temporais da criança 17. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras temporais da criança 17.

As amostras das 11 crianças foram analisadas em conjunto em determinados períodos de tempo, nos primeiros 2 dias, no sétimo dia, primeiro mês, terceiro, sexto e décimo segundo meses de vida (Figuras 14 a 19). Tanto as análises de agrupamento quanto as análises de correspondência desses períodos mostraram o aumento do número de bandas da microbiota das amostras iniciais para o primeiro ano de vida.

No início da colonização é possível observar um menor compartilhamento de bandas/espécies entre as amostras. O dendrograma gerado a partir dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 2 dias não apresentou agrupamentos evidentes. É possível observar um menor compartilhamento de bandas. O dendrograma também mostrou um total de 24 bandas para as 8 amostras analisadas nesse período (Figura 14A).

Para a criança 2 foram coletadas duas amostras de 2 dias com algumas horas de diferença entre as coletas. Desse modo as duas amostras foram incluídas na análise e tanto pelo dendrograma quanto pela AC vemos que essas duas amostras são bastante semelhantes e inter-relaciondas (Figura 14A e B).

Apesar da amostra de 2 dias da criança 17 apresentar somente duas bandas não foi necessária a sua remoção nessa análise, pois devido ao compartilhamento de uma banda com as outras amostras de mesmo período e um menor número de bandas nas mesmas, as visualizações do dendrograma e do gráfico de AC não ficaram prejudicadas (Figura 14A e B).

As bandas que foram sequenciadas para as amostras das crianças estão indicadas no dendrograma (Figura 14A). Banda 1: 97 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 2: 98 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 3: 99 % de similaridade com *Klebsiella* não cultivada; banda 4: 97 % de similaridade com *Bifidobacterium dentium* e banda 5: 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado.

As principais fontes de contaminação nas amostras de 2 dias são as bactérias da microbiota materna presentes no canal do parto e na pele que

entram em contato com a criança principalmente durante a amamentação. Após esse período as principais fontes de contaminação são aleitamento, alimentação e bactérias presentes no ambiente.

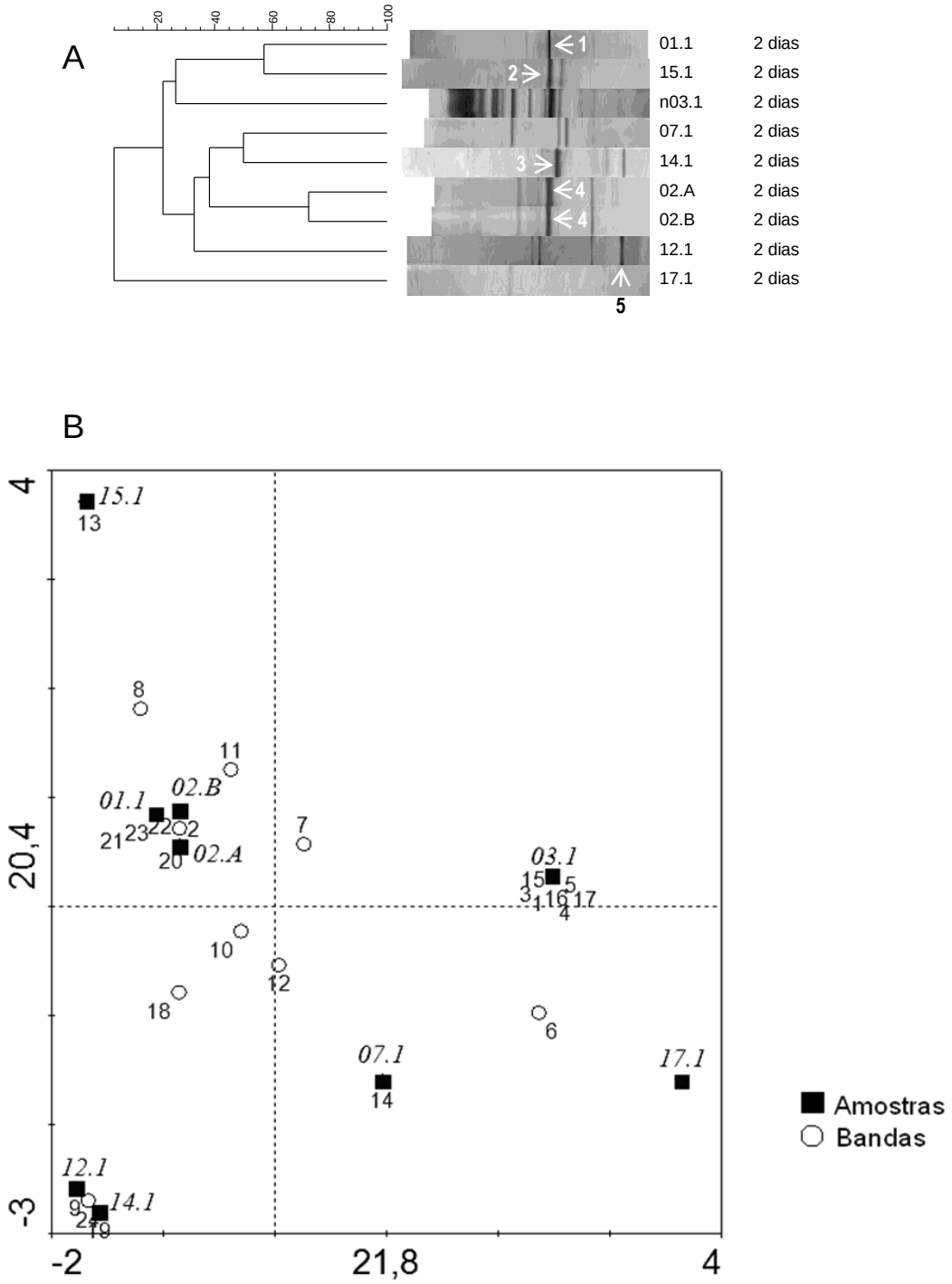


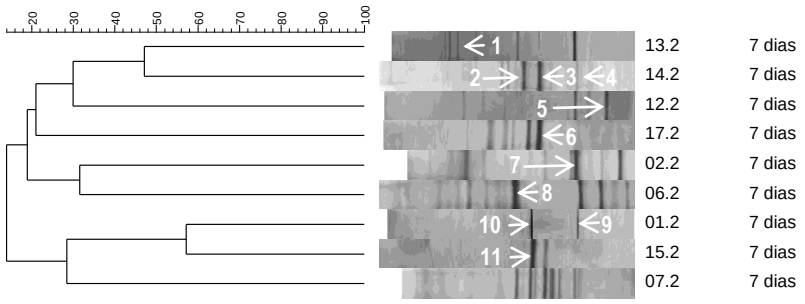
Figura 14 – A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 2 dias. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 2 dias.

O dendrograma gerado a partir das amostras de 7 dias também não apresentou agrupamentos evidentes. É possível observar um aumento no número de bandas em relação ao período anterior, mas do mesmo modo não é possível observar um compartilhamento de bandas comuns entre essas amostras. O dendrograma mostrou um total de 41 bandas nas 9 crianças analisadas nesse período (Figura 15A).

No gráfico da análise de correspondência é possível observar a maior relação entre as amostras das crianças 1, 7 e 15, mas próximas entre si do que em relação às outras amostras (Figura 15B). Essas amostras embora com pouco compartilhamento de bandas entre si observado no dendrograma (Figura 15A) estão em um ramo separado no dendrograma.

As bandas que foram sequenciadas para as amostras das crianças estão indicadas no dendrograma. Banda 1: 98 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 2: 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 3: 99 % de similaridade com *Klebsiella* não cultivada; banda 4: 87% de similaridade com *Bifidobacterium* não cultivado; banda 5: 99 % de similaridade com *Bifidobacterium* não cultivado; banda 6: 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 7: 97 % de similaridade com *Bifidobacterium dentium*; banda 8: 100 % de similaridade com *Escherichia* sp.; banda 9: 94 % de similaridade com *Bifidobacterium pseudocatenulatum*; banda 10: 97 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado e bada 11: 98 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado (Figura 15A).

A



B

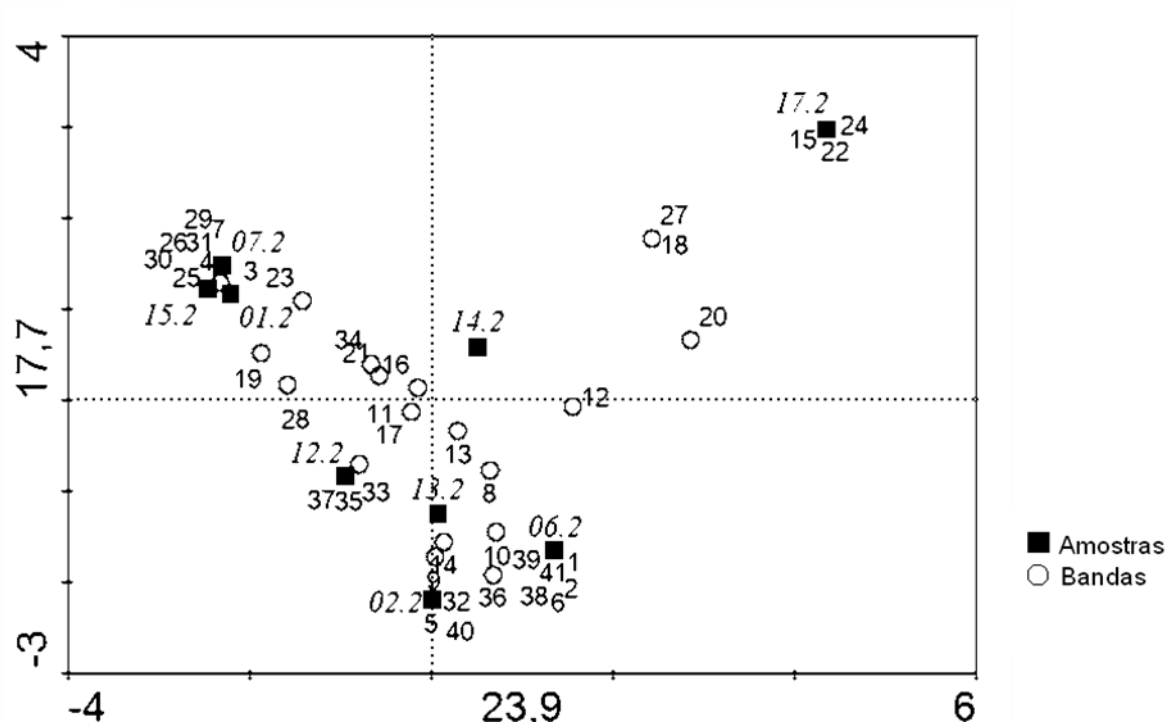


Figura 15 – A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 7 dias. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 7 dias.

O dendrograma gerado a partir do perfil de bandas do DGGE das amostras de 1 mês também mostra uma grande variedade de bandas, mas sem o compartilhamento de bandas comuns entre as amostras analisadas (Figura 16A). A analise de similaridade mostrou um total de 34 bandas distintas presente nas 7 amostras analisadas nesse período.

As análises do dendrograma e do gráfico da análise de correspondência mostraram o maior distanciamento das amostras de 1 mês das crianças 1, 2 e 17 em relação às demais amostras. Pelo gráfico da AC é possível observar a presença de bandas criança específica (Figura 16B). O histórico mensal aponta que todas as crianças analisadas receberam aleitamento materno exclusivo nesse período (Tabela 2).

As bandas que foram sequenciadas para as amostras das crianças estão indicadas no dendrograma. Banda 1: 97 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 2: 94 % de similaridade com *Bifidobacterium pseudocatenulatum*; banda 3: 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 4: 99 % de similaridade com *Bifidobacterium* não cultivado; banda 5: 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 6: 99 % de similaridade com *Lactobacillus gasseri*; banda 7: 98 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado e banda 8: 92 % de similaridade com *Bifidobacterium* não cultivado (Figura 16A).

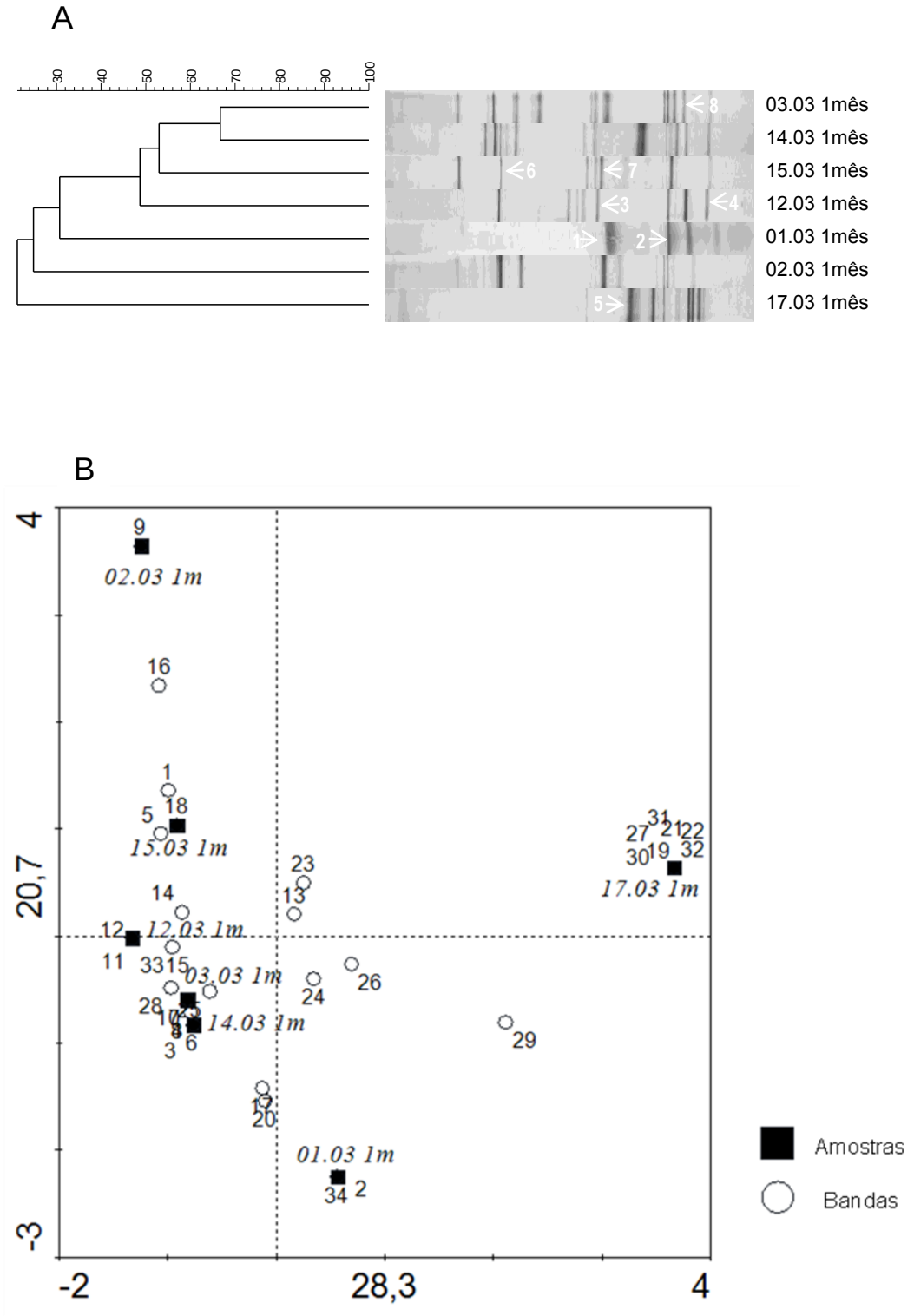


Figura 16 – A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 1 mês. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 1 mês.

A partir dos 3 meses de idade se tem início do compartilhamento de algumas bandas comuns entre as amostras crianças. O histórico mensal das crianças aponta que já no segundo mês de vida para as crianças 2 e 7 se tem o início da introdução de aleitamento misto (leite materno e fórmulas artificiais).

A análise do dendrograma das amostras do período de 3 meses de vida mostra uma baixa similaridade entre as amostras, mas é possível observar o compartilhamento de algumas bandas entre elas (Figura 17A). O dendrograma mostrou um total de 27 bandas para 5 amostras analisadas nesse período. As bandas que foram sequenciadas para as amostras das crianças estão indicadas no dendrograma. Banda 1: 100 % de similaridade com *Escherichia* sp; banda 2: 98 % de similaridade com micro-organismo não cultivável; banda 3: 99 % de similaridade com *Klebsiella* não cultivada; banda 4: 87 % de similaridade com *Bifidobacterium* não cultivado; banda 5: 97 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado e banda 6: 94 % de similaridade com *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Figura 17A).

No gráfico da análise de correspondência observa-se algumas bandas compartilhadas, localizadas próximas à origem dos eixos 1 e 2 e muitas bandas amostras específicas (Figura 17B).

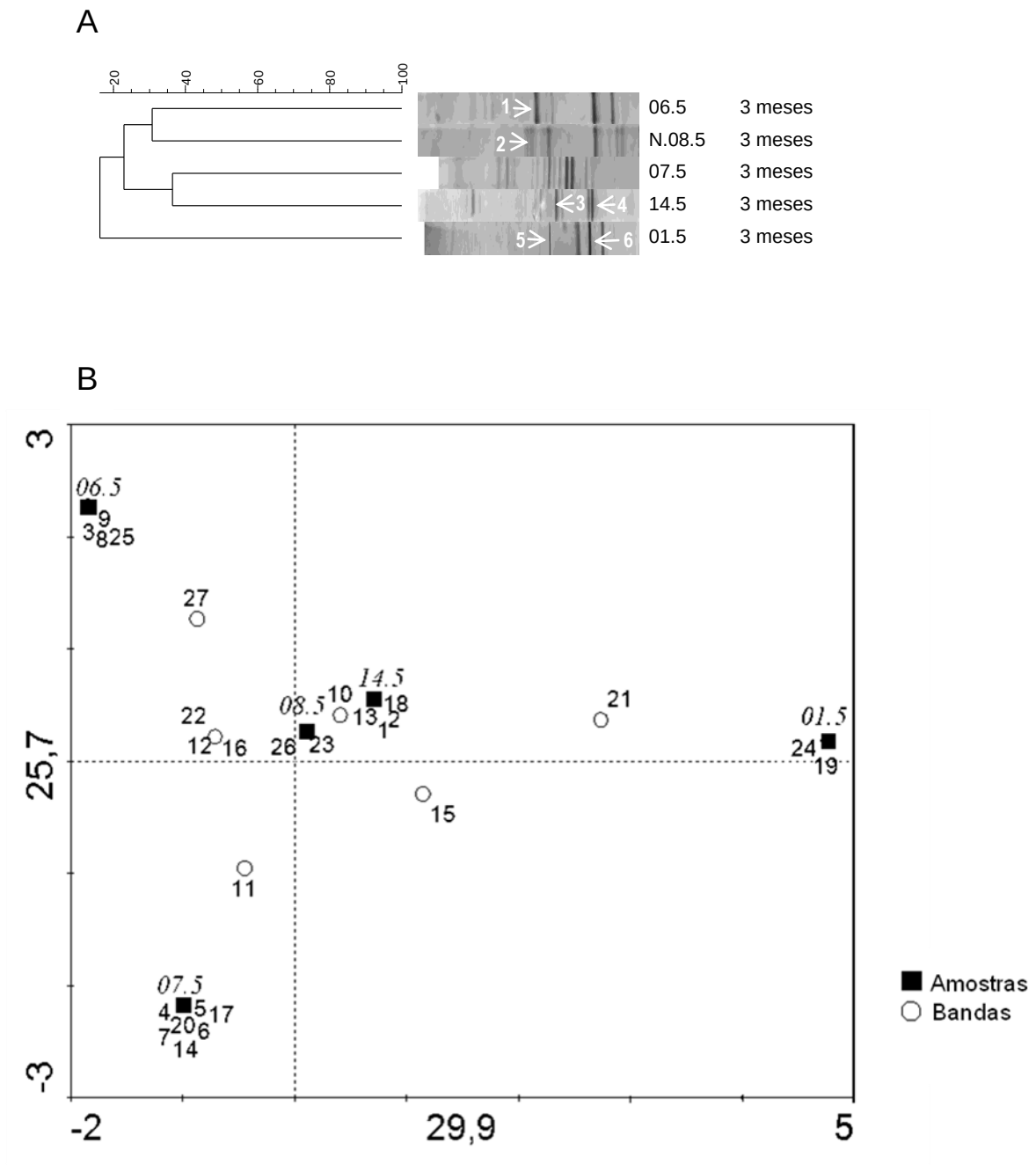


Figura 17 – A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 3 meses. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 3 meses.

Durante o período de 6 meses de vida já se tem a introdução de alimento sólidos na dieta das crianças (tabela 2).

O dendrograma de similaridade gerado a partir das amostras de 6 meses não mostra agrupamentos evidentes entre elas. É possível observar o compartilhamento de algumas bandas comuns. A análise mostrou um total de 22 bandas distintas presentes nas 5 amostras analisadas nesse período. As bandas que foram sequenciadas para as amostras das crianças estão indicadas no dendrograma. Banda 1: 97 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 2: 94 % d similaridade com *Bifidobacterium pseudocatenulatum*; banda 3: 100 % de similaridade com *E. coli* clone KC030; banda 4: 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 5: 97 % de similaridade com *Bifidobacterium dentium*; banda 6: 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 7: 87 % de similaridade com *Bifidobacterium* não cultivado; banda 8: 98 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado e banda 9: 99 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado (Figura 18A).

O gráfico da análise de correspondência mostra as amostras de 6 meses dispersas sobre os eixos 1 e 2 indicando baixa similaridade entre elas e a presença de bandas amostra específicas (Figura 18B).

As análises das amostras dos períodos de 3 e 6 meses ficaram prejudicadas devido ao menor número de amostras analisadas nesses pontos já que são análises não paramétricas e os resultados dependem exclusivamente das características de cada amostra.

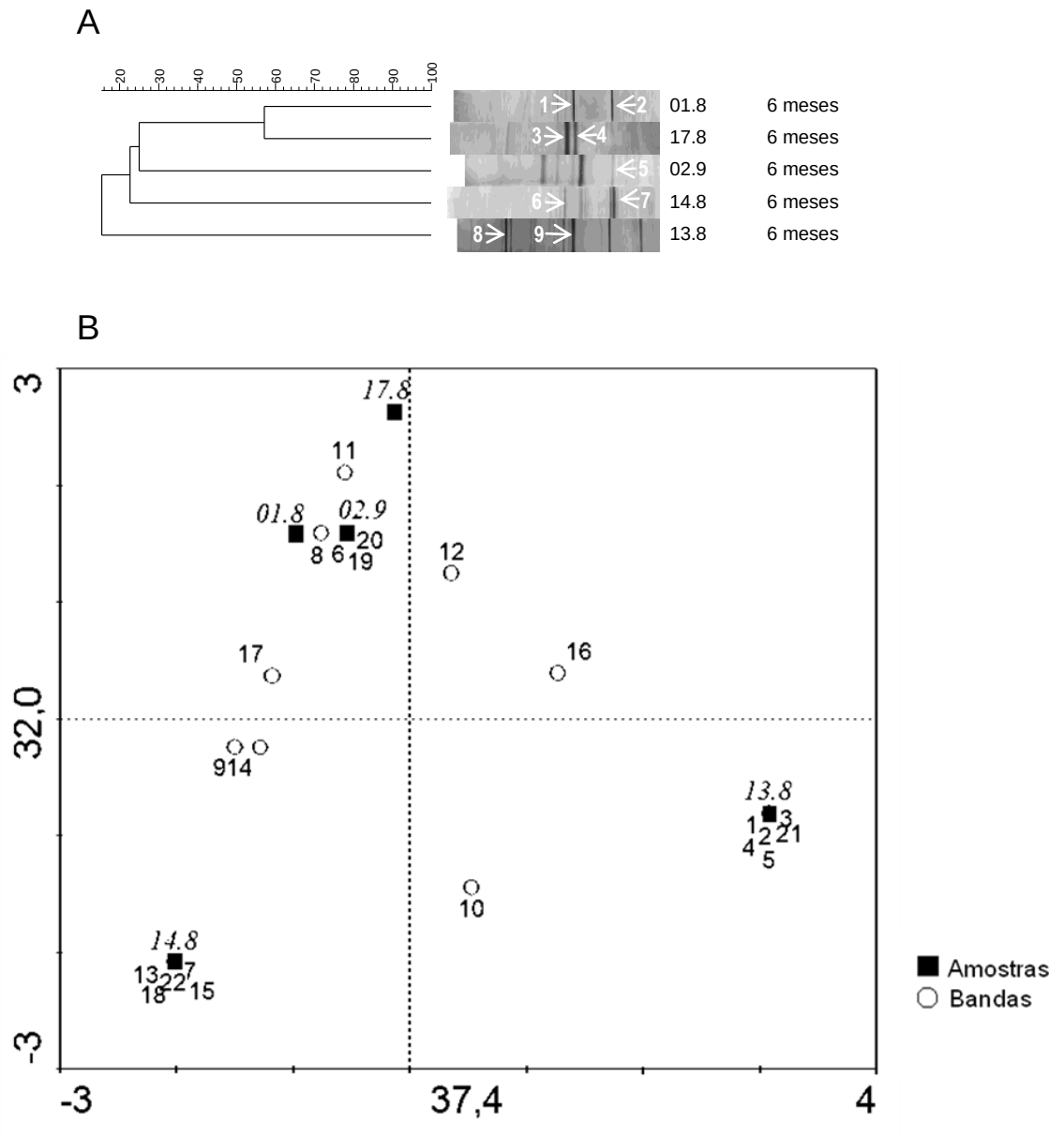


Figura 18 – A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 6 meses. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 6 meses.

A análise do dendrograma gerado a partir do perfil de bandas das amostras de 12 meses das crianças não apresentou a grupamentos evidentes, sendo a maior porcentagem de similaridade (50 %) entre as amostras das crianças 1 e 7. O dendrograma mostrou um total de 37 bandas distintas presentes nas 9 amostras analisadas nesse período. As bandas que foram sequenciadas para as amostras das crianças estão indicadas no dendrograma. Banda 1: 97 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 2: 94 % de similaridade com *Bifidobacterium pseudocatenulatum*; banda 3: 100% de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 4: 100% de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 5: 100 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado; banda 6: 99 % de similaridade com micro-organismo não cultivado; banda 7: 98 % de similaridade com *Bifidobacterium longum* subsp. l*ongum*; banda 8: 98 % de similaridade com micro-organismo ainda não cultivado (Figura 19A).

No gráfico da análise de correspondência é possível observar o compartilhamento de bandas comuns bem como a presença de bandas amostras específica (Figura 19B).

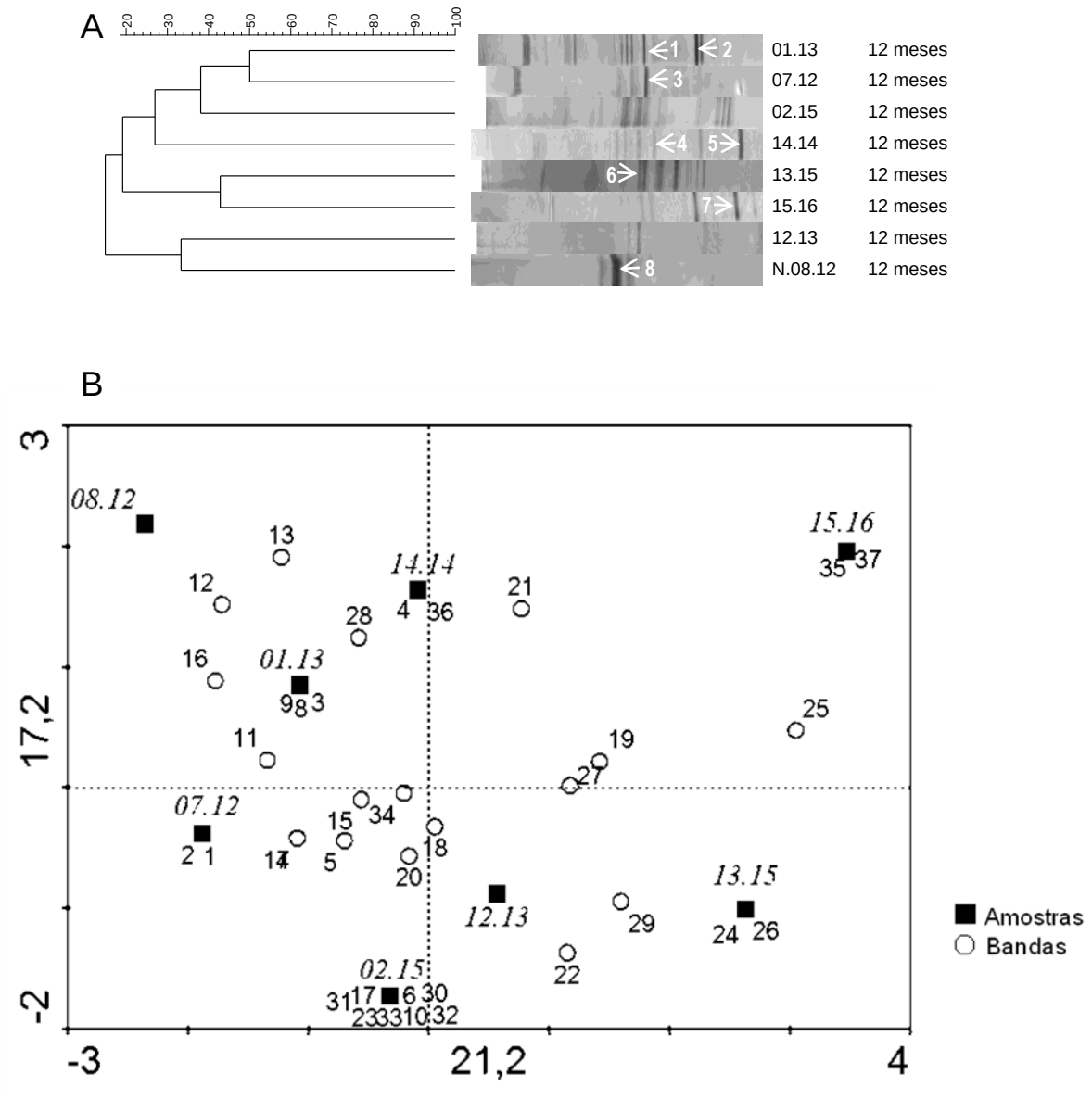
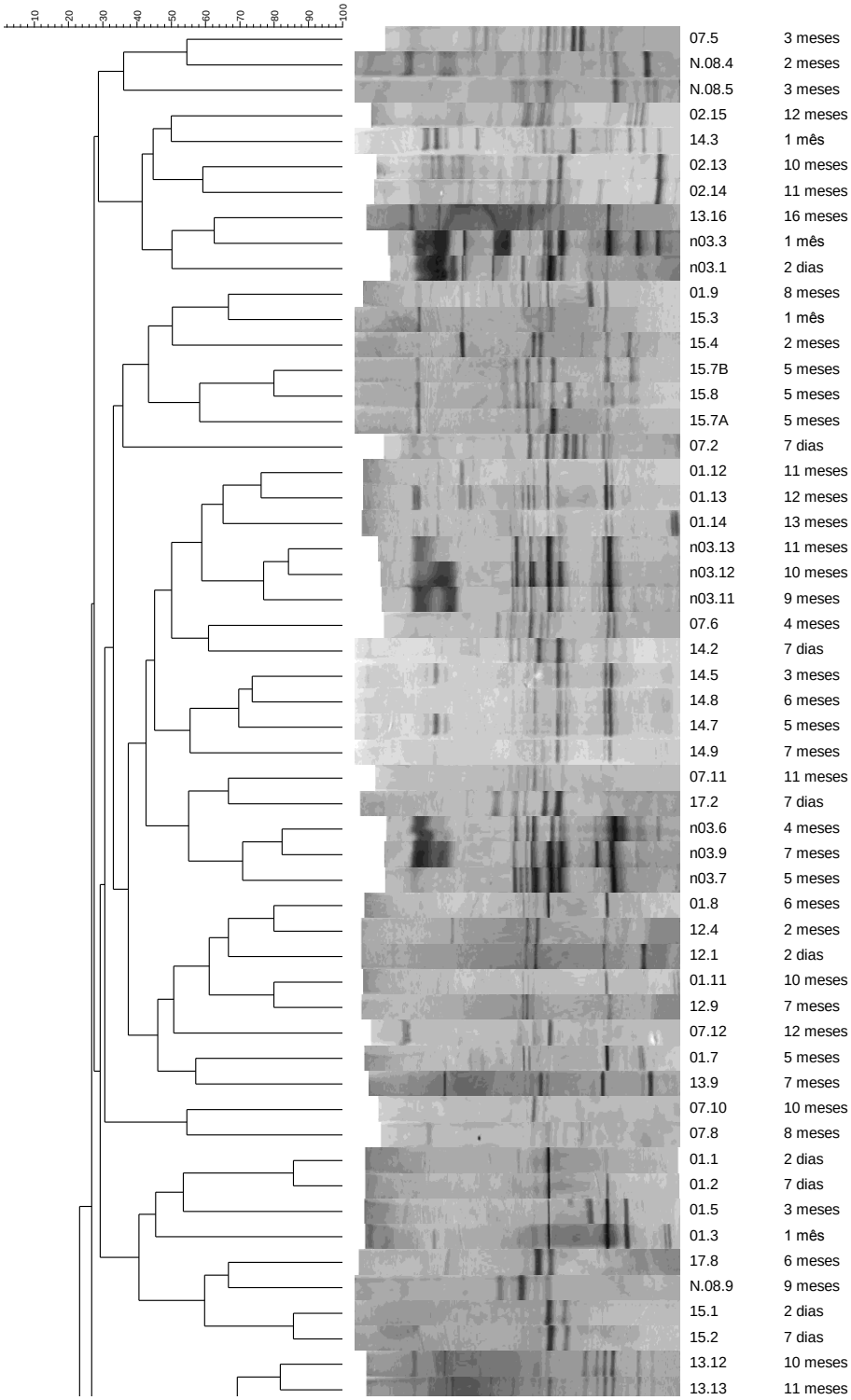


Figura 19 – A. Dendrograma de similaridade gerados dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir das amostras de 12 meses. Método UPGMA, coeficiente de Dice. As setas e números indicam as bandas sequenciadas. B. Gráfico gerado pela análise de correspondência obtida dos perfis de bandas do DGGE das amostras de 12 meses.

Ao longo do período de estudo foi evidenciado uma sucessão ecológica nas microbiotas analisadas devido ao aumento e flutuação de bandas/espécies. Através das análises realizadas não foi possível observar perfis de bandas semelhantes entre as crianças, pois não vemos agrupamentos de amostras semelhantes nos dendrogramas e as AC mostram tanto um maior compartilhamento das bandas entre as amostras mais tardias quanto a presença de muitas bandas específicas para cada criança.

A análise de similaridade gerada a partir do perfil de bandas do DGGE de todas as amostras das crianças analisadas não mostrou agrupamentos relacionados a períodos de tempo de coleta das amostras (Figura 20). O que se pode observar são agrupamentos entre as amostras de uma mesma criança, o que indica que o processo de estabelecimento da microbiota das crianças analisadas foi individual.


10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
07.5 3 meses
N.08.4 2 meses
N.08.5 3 meses
02.15 12 meses
14.3 1 mês
02.13 10 meses
02.14 11 meses
13.16 16 meses
n03.3 1 mês
n03.1 2 dias
01.9 8 meses
15.3 1 mês
15.4 2 meses
15.7B 5 meses
15.8 5 meses
15.7A 5 meses
07.2 7 dias
01.12 11 meses
01.13 12 meses
01.14 13 meses
n03.13 11 meses
n03.12 10 meses
n03.11 9 meses
07.6 4 meses
14.2 7 dias
14.5 3 meses
14.8 6 meses
14.7 5 meses
14.9 7 meses
07.11 11 meses
17.2 7 dias
n03.6 4 meses
n03.9 7 meses
n03.7 5 meses
01.8 6 meses
12.4 2 meses
12.1 2 dias
01.11 10 meses
12.9 7 meses
07.12 12 meses
01.7 5 meses
13.9 7 meses
07.10 10 meses
07.8 8 meses
01.1 2 dias
01.2 7 dias
01.5 3 meses
01.3 1 mês
17.8 6 meses
N.08.9 9 meses
15.1 2 dias
15.2 7 dias
13.12 10 meses
13.13 11 meses

Continua

Continuação

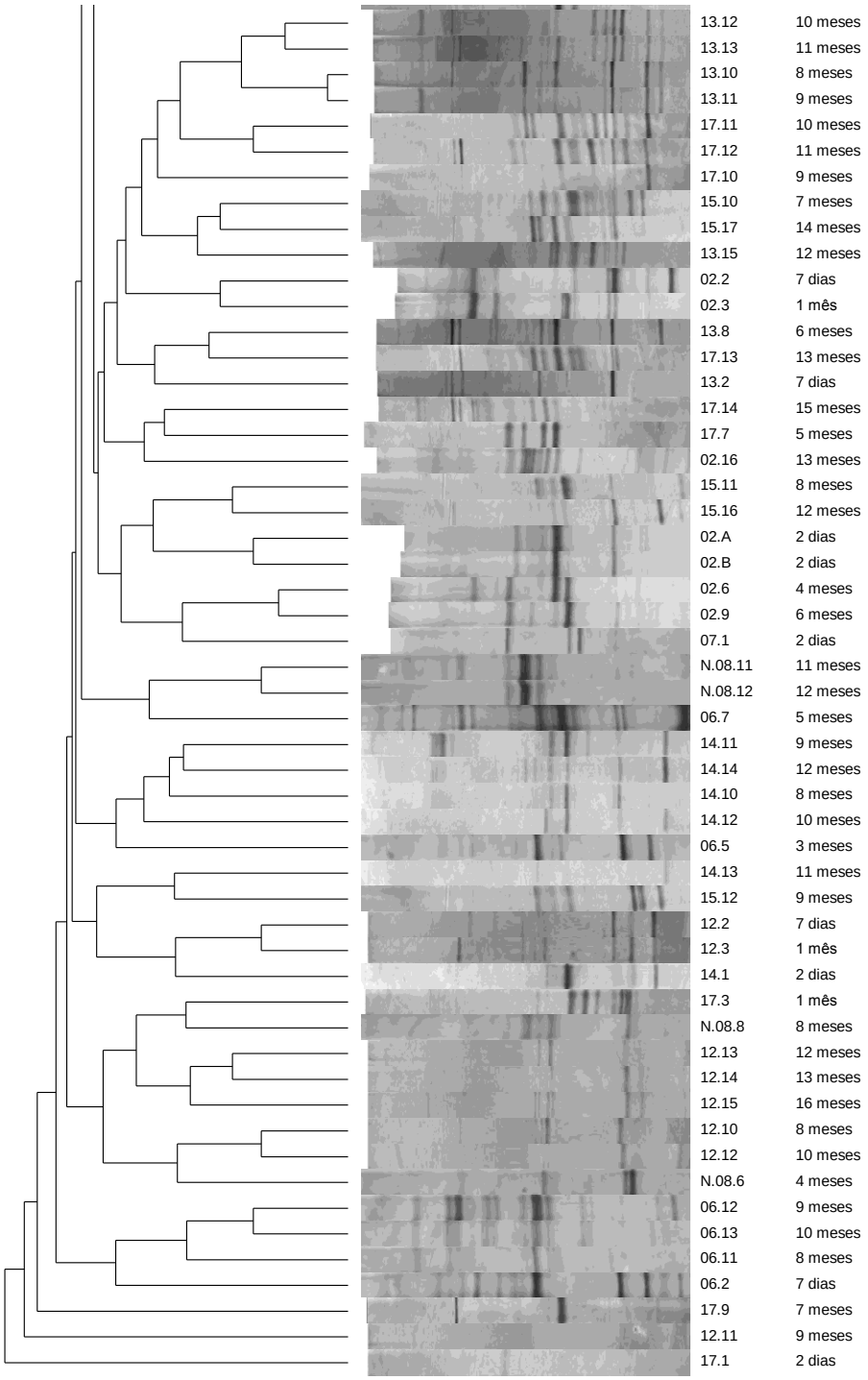


Figura 20 - Dendrograma de similaridade gerado dos perfis de PCR-DGGE obtido a partir de todas as amostras analisadas nesse estudo. Método UPGMA, coeficiente de Dice.

Tabela 2 – Histórico mensal das crianças analisadas.

Criança	Antecedentes maternos	Características	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês
1	rinite atb 2 meses antes do parto Maus cuidados em relação à criança ITU	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	Materno	Materno Chá c/ açúcar	Materno	Misto Cachorro em casa
2	2 filhos ITU 1° trimestre animal em casa, maus cuidados em relação à criança	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	Materno Mudança de casa	Misto Leite integral+água	Misto Água	Misto Danoninho, frango, frutas, legums
3	3 filhos alérgicos Renda baixa Estudou até a 4ª série	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	Materno Chupeta Cefalexina com 7 dias de vida	Materno Chupeta	Materno Mel Chupeta	Materno
6	rinite 2 filhos	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	materno chá conjuntivite Atb tópico	materno chupeta	materno resfriado	materno suco laranja ovo, legumes, peixe, macarrão creche
7	1° filho cachorro	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	materno	misto leite artificial	leite em pó engrossante	leite em pó
8	3 filhos casa s/ janela umidade Noções de higiene precária no cuidado com a criança	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	materno água e chá chupeta	misto engrossante pai empregado	misto leite formulado frutas	misto danone diarréia resfriado
12	ITU cefalexina 7° mês	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	materno	materno Otite - Atb	materno	materno
13	1° filho alergia na família Mãe atenciosa, criança bem cuidada, gato	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	materno chupeta	materno	materno	materno
14	HVC, HIV 2 filhos, cachorro Criança e mãe com aspectos sujos	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	materno	materno chupeta	materno	materno
15	carente socialmente 1 filho	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	materno chupeta	materno	materno	misto leite em pó
17	2 filhos alergia familiar	Aleitamento Alimentação Mudanças familiares Intercorrência clínica	materno	materno	materno	materno

Tabela 2 – Histórico mensal das crianças analisadas. Continuação.

Criança	Características	5º mês	6º mês	7º mês	8º mês
1	Aleitamento	misto	misto	misto	misto
	Alimentação			frutas	
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica				
2	Aleitamento	misto	misto	leite integral	leite integral
	Alimentação	engrossante	geral	geral	geral
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica				
3	Aleitamento	Materno	Misto	Misto	Misto
	Alimentação		Feijão, carne, frango, macarrão		legumes
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica	diarréia + bronquiolite viral	Neurofibromatose - estrabismo		
6	Aleitamento	materno			
	Alimentação		geral	geral	geral
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica			otite Atb	urticária - atl
7	Aleitamento	leite em pó	leite em pó	leite em pó	leite fluido
	Alimentação	frutas, legumes. Carne, feijão, arroz			açúcar
	Mudanças familiares	pai desempregado	pai empregado		
	Intercorrência clínica	diarréia 6d			
8	Aleitamento	leite fluido	leite fluido	leite fluido	leite fluido
	Alimentação	legumes, verdura			peixe
	Mudanças familiares	carne, feijão, pão			febre, resfriado
	Intercorrência clínica	diarréia IR atb			diarréia, alergia de pele - atl
12	Aleitamento	misto	misto	misto	misto
	Alimentação			carne, frango e peixe	
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica	diarréia	diarréia		
13	Aleitamento	materno	misto	misto	misto
	Alimentação	caldo de feijão	frutas, raízes,	legumes	verdura, arroz
	Mudanças familiares		pão, bolacha		macarrão
	Intercorrência clínica				
14	Aleitamento	materno	materno	leite em pó + materno	Leite pó + materno
	Alimentação			frutas, legumes,	feijão, arroz,
	Mudanças familiares	nistatina oral - monilíase	tosse, coriza	caldo feijão e carne	pão, macarrão
	Intercorrência clínica				
15	Aleitamento	misto	misto	leite em pó	leite em pó
	Alimentação	leite em pó	leite em pó	peixe, pão, bolacha	leite fluido
	Mudanças familiares	dieta geral + acúcar e carne			
	Intercorrência clínica	internação - epilepsia grave		2 internações EG	
17	Aleitamento	materno	materno	misto	misto
	Alimentação			frutas, legumes, bolacha	carne, açúcar
	Mudanças familiares			raízes, pão	24 dias de diarréia
	Intercorrência clínica		Otite ATB	urticária - Atl oral	desnutrição

Tabela 2 – Histórico mensal das crianças analisadas. Continuação.

Criança	Características	9º mês	10º mês	11º mês	12º mês
1	Aleitamento	misto	misto	misto	misto
	Alimentação			geral	geral
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica	atb - IR			baixo ganho de peso
2	Aleitamento	leite integral	leite integral	leite integral	leite integral
	Alimentação	geral	geral	geral	geral
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica	candidíase oral			baixo ganho de peso
3	Aleitamento	misto	misto		
	Alimentação	carne, frango	ovo, pão	geral	geral
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica				diarréia 7 dias
6	Aleitamento				
	Alimentação	geral	geral	geral	geral
	Mudanças familiares	mudança de casa	hamster		baixo ganho de peso
	Intercorrência clínica	diarréia			resfriado
7	Aleitamento	leite fluido	leite fluido	leite fluido	leite fluido
	Alimentação	ovo	geral	geral	geral
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica				
8	Aleitamento	leite fluido	leite fluido	leite fluido	leite fluido
	Alimentação		ovo	geral	geral
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica		diarréia, tosse, coriza	otite - atb	
12	Aleitamento	misto	misto	misto	misto
	Alimentação	feijão, ovo, macarrão	geral	geral	geral
	Mudanças familiares			melhora de vida	
	Intercorrência clínica	sinusite - Atb			
13	Aleitamento	misto	misto	misto	misto
	Alimentação	feijão	geral	geral	açúcar
	Mudanças familiares				Bom ganho de peso
	Intercorrência clínica				Sem intercorrências
14	Aleitamento	leite fluído + m	leite fluído + m	leite fluído +m	leite fluído + m
	Alimentação	açúcar, engrossante			
	Mudanças familiares	ovo, frango			
	Intercorrência clínica	sinusite - Atb			Criança desnutrida
15	Aleitamento	leite fluido	leite fluido	leite fluido	leite fluido
	Alimentação	geral	geral	geral	geral
	Mudanças familiares				anemia leve
	Intercorrência clínica	2 episódios de fezes amolecidas	3 internações EG		1 internação EG
17	Aleitamento	misto	misto	misto	misto
	Alimentação		ovo		leite fluido
	Mudanças familiares				
	Intercorrência clínica		gripe forte	febre, exantema	IR

5. Discussão

Durante o primeiro ano de vida da criança, a instalação da microbiota intestinal está sujeita a intervenções de fatores externos, como tipo de parto, alimentação e condições ambientais, além de fatores inerentes ao hospedeiro. Estudos mostram o início da estabilização da microbiota em torno do segundo ano de vida. Após a estabilização a sua composição permanece estável por toda fase adulta do indivíduo (ROGER; MCCARTNEY, 2010).

Devido à importância do tema e aos poucos estudos brasileiros descritos na literatura é de grande valia o conhecimento da instalação e estabilização da microbiota intestinal. Neste estudo o objetivo foi avaliar o processo de colonização da microbiota bacteriana intestinal durante o primeiro ano de vida em onze crianças.

Para a avaliação da instalação da microbiota intestinal foi utilizada a técnica de PCR-DGGE. Na técnica de PCR-DGGE os fragmentos de mesmo tamanho dos produtos da reação de PCR são separados com base nas diferenças de suas bases. A separação acontece devido à diminuição na mobilidade da dupla fita de DNA parcialmente desnaturada em um gel de poliacrilamida com um gradiente linear de desnaturação (MUYZER; SMALLA 1998).

O gene 16S *rRNA* contém regiões altamente conservadas entre as espécies bacterianas e regiões hiper-variáveis (regiões V) que contém as características filogenéticas específicas de grupos e espécies bacterianas (TANNOCK, 2002). Nesse trabalho foi utilizado como alvo a região V3 do gene 16S *rRNA* por apresentar um padrão com maior número de bandas no gel de DGGE (YU; MORRISON, 2004).

O processo de colonização do trato gastrointestinal pode ser dividido em diferentes estágios. O estagio inicial ocorre durante o parto e nas primeiras horas de vida. O segundo estágio compreende a fase de amamentação e o terceiro estágio se refere à introdução de alimentos sólidos na dieta da criança (ROGER; MCCARTNEY, 2010).

No início da colonização, a microbiota de crianças amamentadas com fórmulas artificiais se apresenta mais diversa em relação às crianças amamentadas exclusivamente com leite materno (FAVIER; VOS; AKKEMANS, 2003; ROGER; MCCARTNEY, 2010). Crianças amamentadas exclusivamente com leite materno tem uma microbiota intestinal com predomínio da colonização por bifidobactérias ao passo que crianças amamentadas com fórmulas artificiais apresentam grande prevalência de enterobactérias (FAVIER et al., 2002).

No presente estudo os resultados mostraram a colonização por bifidobactérias nas amostras iniciais de 2 dias. Foi identificada banda correspondente a bifidobactéria nas amostras de 6 crianças analisadas. Somente em uma criança a banda correspondente a bifidobactéria permaneceu em todas as amostras após seu surgimento, nas outras crianças ocorreu uma flutuação da presença dessa banda. Nas crianças analisadas não foi possível identificar uma padrão de aleitamento. Esses dados vão de encontro a um estudo realizado na Holanda com análise do estabelecimento da microbiota em duas crianças, uma amamentada exclusivamente com leite materno e outra amamentada inicialmente com leite materno e posterior aleitamento com leite formulado, mostrou que os perfis das duas crianças apresentaram colonização por bifidobactérias a partir do terceiro dia de vida. Para a criança amamentada exclusivamente com leite materno a banda correspondente a bifidobactéria no gel de DGGE apareceu no terceiro dia de vida e permaneceu até o desmame da criança. Para a outra criança a introdução de leite formulado provocou um aumento na complexidade da microbiota e após o desmame houve uma flutuação na presença da banda correspondente à bifidobactéria (FAVIER et al, 2002).

Em outro estudo longitudinal de investigação da instalação da microbiota de crianças amamentadas exclusivamente com leite materno em relação à crianças que foram amamentadas por fórmula artificial é observado que antes do desmame a microbiota das crianças amamentadas com fórmulas artificiais é mais diversa em relação às amamentadas com leite materno e após o desmame é observado uma alteração na diversidade da microbiota nos dois

grupos. As análises das amostras colhidas mensalmente até os 12 meses de idade indicam que as crianças amamentadas com fórmula artificial apresentam uma maior estabilidade da microbiota (ROGER; MCCARTNEY, 2010).

A introdução de alimentos sólidos na dieta da criança provoca uma grande mudança na diversidade da microbiota intestinal (FAVIER; VOS; AKKEMANS, 2003; ROGER; MCCARTNEY, 2010). A composição da dieta recebida pela criança é tida como um fator de muita influencia na diversidade da microbiota intestinal (NIELSEN et al, 2007). Com a introdução de alimentos sólidos é possível observar a alteração do perfil da microbiota, com aumento do número de bandas, fato que é observado na maioria das crianças analisadas (crianças 1, 3, 7, 12, 14, e 15) no presente estudo.

A introdução precoce de alimentos na dieta está associada à instabilidade no estabelecimento da microbiota intestinal o que pode ser observado durante o processo de sua instalação nas crianças 2, 6 e 8. Devido ao fato da alimentação sólida provocar mudanças na microbiota, tornando-a mais complexa, os resultados obtidos mostraram que nas crianças que tiveram a introdução precoce de alimentos sólidos na dieta houve uma grande flutuação de bandas durante o período analisado. Os resultados também mostraram o não compartilhamento de banda comum nas amostras de uma mesma criança.

A utilização de antibióticos bem como a duração de sua administração são fatores que influenciam a colonização primária da microbiota. No presente estudo as crianças 1, 3, 6, 8, 12, 14 e 17 utilizaram antibiótico durante o primeiro ano de vida e foram observadas alterações nos perfis de bandas de suas amostras. No período que segue a utilização do antibiótico é observada uma diminuição no número de bandas no perfil. Após a suspensão do uso do antibiótico observa-se restabelecimento da microbiota observando-se novamente o aumento do número de bandas no perfil. Essas observações vão de acordo com o estudo realizado com quatro crianças no qual o uso de antibiótico foi relacionado com diminuição na diversidade da microbiota (FAVIER; VOS; AKKEMANS, 2003; SONHJINDA, 2005).

A criança 15 foi internada por sete vezes ao longo do primeiro ano de vida devido a quadro de epilepsia grave. No sétimo mês a criança 15 foi internada por 2 vezes, a amostra seguinte a esse período, amostra de 8 meses, apresentou uma diminuição no número de bandas no perfil do DGGE. No mês seguinte, 9 meses, foi possível observar a recuperação da microbiota. Embora essa criança tenha tido interferência pela microbiota hospitalar, durante os períodos de internação, os resultados mostraram que o processo global da instalação da sua microbiota intestinal não sofreu alterações em relação a esse fator. Fato que sugere que a influência da microbiota hospitalar provoca alterações temporárias na microbiota, que é mantida por fatores relacionados ao aleitamento, à alimentação e características individuais da criança.

A desnutrição e os cuidados com a criança como os relacionados à higiene e condições sanitárias também influenciam o processo de colonização (KAU et al, 2011). Pode-se observar em algumas crianças estudadas o baixo ganho de peso ao final do primeiro ano de vida. No caso da criança 2, que apresentou uma grande instabilidade no processo de estabelecimento da microbiota, no décimo segundo mês de vida foi relatado no histórico mensal baixo ganho de peso e nas amostras coletada após esse período, amostra de 13 meses, houve uma diminuição do número de bandas no perfil dessa amostra. O histórico mensal da criança 8, que também apresentou colonização instável da microbiota, aponta precárias condições de higiene da mãe no cuidado com a criança e precárias condições de moradia da família, onde cinco pessoas habitam um único cômodo sem janela e com alta umidade. O histórico também aponta que a criança 8 apresentou quatro episódios de diarreia durante o primeiro ano de vida. Esses fatores somados à introdução de alimento sólido precocemente e à fatores individuais podem explicar a instabilidade da colonização inicial da microbiota intestinal nas crianças. Outra criança que também apresentou quadro de desnutrição durante o primeiro ano de vida foi a criança 17. Seu histórico mensal aponta desnutrição no oitavo mês de vida e observa-se uma diminuição de bandas na amostra de 9 meses quando comparada às amostras dos períodos seguintes.

No início das coletas das amostras foi feita a tentativa de se delimitar um grupo homogêneo de pacientes para sua melhor avaliação, mas foram observados eventos diferentes para cada criança o que impossibilitou o delineamento de grupos. Assim cada criança foi analisada individualmente. Alguns períodos determinados foram analisados em conjunto, mas os hiatos entre as coletas das amostras dificultaram tanto as análises individuais de cada criança quanto as análises por períodos específicos.

Devido a uma amostragem pequena, onze indivíduos, não foi possível a realização da análise estatística de dados quantitativos. Considerando-se os dados qualitativos entre amostras e perfis de bandas foi feita análise estatística para dados qualitativos com a utilização de análise multivariada, no caso desse estudo análises de correspondência.

As intensidades das bandas nos géis podem ser utilizadas para calcular índices de riqueza e diversidade (FROMIN, 2002; ZWIELEHNER et al., 2009), mas é importante destacar que nesse trabalho foram considerados apenas os dados qualitativos de presença e ausência de bandas. As intensidades das bandas não foram consideradas em relação aos índices de diversidade devido às características das amostras, particularidades no processo de extração de DNA, e viés da reação de PCR (BURR et al., 2006; ARAÚJO; SCHNEIDER, 2008).

Após as análises dos dados do presente estudo foi possível observar que cada criança apresentou um perfil distinto de colonização. No início da colonização verifica-se uma menor quantidade de bandas nas crianças estudadas bem como um menor compartilhamento de bandas entre as crianças. Ao longo do período de estudo foi evidenciada uma sucessão ecológica nas microbiotas analisadas devido ao aumento do número de bandas e maior compartilhamento de bandas comuns entre as crianças. Esses dados corroboram o estudo realizado na Holanda, no qual 14 bebês foram monitorados ao longo do primeiro ano de vida e os resultados mostraram que a composição da microbiota infantil é mais simples que a microbiota de adultos e que é específica para cada uma delas. Apresenta um perfil caótico nos primeiros meses de vida e se torna mais complexa quando se aproxima, ao

longo do tempo, ao padrão da microbiota de adultos (ZOETENDAL; RAJILIC-STOJANOVIC, 2011).

A técnica de PCR-DGGE se mostrou uma boa ferramenta para a análise global do desse processo, pois foi possível a análise em um mesmo gel de todas as amostras coletadas de uma mesma criança. O presente estudo mostrou uma relação direta entre a composição da microbiota e os fatores externos relacionados às crianças, como aleitamento, alimentação e uso de medicamentos. Assim, os dados obtidos por PCR-DGGE mostram que os perfis das comunidades bacterianas são indicadores eficazes das alterações externas e individuais de cada criança.

O método apresenta algumas limitações como o próprio viés da reação de PCR quanto a amplificações preferenciais de determinados alvos na sequência de DNA, a não amplificação por deficiência durante a hibridização do oligoiniciador com a sequência alvo e a presença de mais de uma cópia do gene 16S *rRNA* em algumas espécies bacterianas e a concatenação de bandas durante a separação dos fragmentos por eletroforese sendo necessário o recorte no gel da banda de interesse para clonagem e sequenciamento para sua identificação (MUYZER; SMALLA, 1998).

As vantagens do método para estudo de comunidades microbianas estão relacionadas ao menor custo da técnica, menos laboriosa e mais rápida em relação à realização de biblioteca genômica, a análise simultânea de várias amostras e a relação direta entre alterações nos perfis e mudanças externas (MUYZER; SMALLA, 1998).

Embora os resultados observados nesse estudo, conjuntamente com outras análises realizadas em paralelo em nosso grupo de pesquisa, tragam contribuições relevantes ao processo inicial de estabelecimento da microbiota intestinal em um grupo de crianças saudáveis no Brasil, há ainda a necessidade de melhor compreender esse processo devido a grande heterogeneidade da população brasileira.

6. Conclusões

Com o uso da técnica de PCR-DGGE foi possível observar uma sucessão ecológica na composição da microbiota das crianças bem como o aumento da sua complexidade conforme a idade.

O estabelecimento da microbiota intestinal mostrou-se particular para cada criança analisada nesse estudo.

A introdução de alimento sólido provoca alteração do perfil da microbiota intestinal aumentando a sua complexidade.

A utilização de antibiótico provoca alteração temporária no perfil da microbiota diminuindo o número de bandas logo após a sua utilização.

A análise de cada criança mostrou que as variações individuais são evidentes e que ao final do primeiro ano de vida podemos observar o início da estabilização da colonização da microbiota intestinal.

Referências

ABRAHAM, C., MEDZHITOV, R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflamatory bowel disease. *Gastroenterology*; 1729-1737, 2011.

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*; 10 ed.: 63-78, 1999.

ADLERBERTH I. Factors influencing the establishment of the intestinal microbiota in infancy .*Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*;62:13-29; discussion 29-33, 2008

ADLERBERTH, I., Wold. A. E. Establishment of the gut microbiota in western infants. *Acta Pediatrica*; 229-238, 2009.

ALVES, L. B., BELDERRAIN, M. C. N., SCARPEL, R. A.. Tratamento multivariado de dados por análise de correpondência e análise de agrupamentos. *Anais do 13o. Encontro de iniciação científica e pós-grasuação do ITA - XIII ENCITA*, 2007.

ARAUJO, J. C., SCHNEIDER, R. P. DGGE with genomic DNA: Suitable for detection of numeracally important organism but not for identification of the most abundant organisms. *Water research*, 2008.

ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the gut microbiome. *Nature*; 473: 174-180, 2011.

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.

BIASUCCI, G., B. BENENATI, L. MORELLI, E G. BOEHM. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *The Journal of Nutrition*, 2008: 1796S-1800S.

BURR, M. D., CLARK, S. J. SPER, C. R., CAMPER, A. K. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. *Microbial Ecology*; 479-486, 2006.

CAMPEOTTO, F., WALIGORA-DUPRIET, A. J., DOUCET-POPULAIRE, F., KALACH N., DUPONT, C., BUTEL, M. J. Establishment of the intestinal microflora in neonates.*Gastroenterol Clin Biol*. May; 31(5):533-42, 2007.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*; 297-314, 2004.

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

FAVIER, C. F., VAUGHAN, E. E. DE VOS, W. M., AKKEMANS, A. D. L.. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in humans neonates. *Applied and Enviomental Microbiology*; 219-226, 2002.

FAVIER, C. F., DE VOS, W. M., AKKEMANS, A. D. L. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe*; 219-229, 2003.

FREITAS, H., JANISSEK-MUNIZ, R. Aprofundando a análise de dados através da análise de correspondência. *Revista Quali & Quanti*, 2008.

FROMIN, N., et al. Statistical analysys of denaturing gel electrophoreisis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbioligy*; 634-643, 2002.

GRÖLUND, M. M., LEHTONEN, O. P., EEROLA, E., KERO, P. Fecal Microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*; 19-25, 1999.

GRÖLUND, M. M., GUEIMONDE, M., LAITINEN, K., KOCIUBINSKI, G., GRÖNROOS, T., SALMINEN, S., ISOLAURI, E. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy*; Dec; 37(12):1764-72, 2007.

GROMPE, M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetica*; Oct;5(2):111-7, 1993.

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

KAU, A. L., AHERN, P. P., GRIFFIN, N. W., GOODMAN, A. L., GORDON, J. I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature Perspective Insight*; (474) 372-474, 2011.

KELLY, D., CONWAY, S. Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Molecular Immunology*; 42: 895–901, 2005.

LIN, H. C., SU, B. H., CHEN, A. C., LIN, T. W., TSAI, C. H., YEH, T. F. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth infants. *Pediatrics*; 1-4, 2005.

MACKIE, R. I., SGHIR, A., GASKINS, H. R. Development microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*; suppl: 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*;19 (2): 106-15, 2007.

MARTÍN, R., HILING, G. H. J.,ZOETENDAL, E. G., SMIDT, H., RODRIGUEZ, J.M. Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potencial rola in the colonization. *J. Appl. Micobiology*; (103) 2638-2644, 2007.

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

MORELLI, L. Postnatal Development of Intestinal Microflora as Influenced by Infant Nutrition. *The Journal of Nutrition*; 1791-1795, 2008.

MUSSO, G., GAMBINO, R., CASSADER, M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annual Review of Medicine*; 361-80, 2011.

MUYZER, G., SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antoinie van Leeuwenhoek*; 127-141, 1998.

MUYZER, G., WAAL, E. C., UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Enviromental Microbiology*; 695-700, 1993.

NETO, J. M. M., MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova*; 467-9, 1998.

NIELSEN, S., NIELSEN, D. S., LAURITZEN, L., JAKOBSEN, M., MICHAELSEN, K. F. Impact of diet on the intestinal microbiota in 10-month-old infants. *J. Pediatric gastroenterology and nutrition*; (44) 613-618, 2007.

OUWEHAND, A., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur J Nutr*; suppl 1:I32-7, 2002.

PARK, H. K., SHIN, S. S. KIM, S. Y. e et al. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J Microbiol*; 345-353, 2005.

PEARSON, W. R., LIMPMAN, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2444-2448, 1988.

PENDERS, J., et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*; 511-521, 2006.

PENNA, F. J., NICOLI, J. R. Microbiota intestinal normal: Conceitos, composição e funções. *Temas de Pediatria*, 2003.

ROGER, L. C., MCCARTNEY A. L. Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbiology*; 3317-3328, 2010.

ROUDIÈRE, L., et al. Optimized PCR-temporal temperature gel electrophoresis compared to cultivation to assess diversity of gut microbiota in neonates. *Journal of Microbiological Methods*; 156-165, 2009.

SANGUINETTI, C. J., NETO, E. D., SIMPSON, A. J. G.. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. 1994.

SARTOR, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Reviews in basic and clinical gastroenterology*; (134) 577-594, 2008.

SCHIFFRIN, E. J., BLUM S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr*; suppl3: S60-S4, 2002.

SCHIFFRIN, E. J. Funções de defesa e homeostática dos probióticos no sistema imune In: Trabulsi, L. R.; Schiffrin, E. J.; Carneiro-Sampaio, M. M. S.; Saavedra, J.M. Os probióticos e a saúde infantil." *Temas de Pediatria*, 2000.

SHERMAN, P. M. et al. Potencial roles and clinical utility of prebiotics in newborns, infants and children: proceedings from a global prebiotic summit meeting, New York City, june 2008. *The journal of pediatrics*; s61-s69, 2008.

SONGJINDA, P., et al. Molecular monitoring of hte developmental bactrial community in the gastrointestinal tract of japanese infants. *Biosci. Biotechnol. Biochem*; 638-641, 2005.

SUCHODOLSKI, J. S., RUAUX, C. G., STEINER, J. M., FETZ, K., WILLIAMS, D. A. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. *J. Clinical microbiology*; 4702-4708, 2004.

TANNOCK, G. W. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *European Journal of Clinical Nutrition*; S44-S49, 2002.

TANNOCK, G. W. New perspections oh the gut microbiota: implications for future research. *Gastrenterology clinics Am*; 34: 361-382, 2005.

THOMPSON-CHAGOYÁN, O. C., MALDONADO, J., GIL, A.. Colonization and impact of desease and other factor on intestinal microbita. *Dig Dis Sci*; 2069-2077, 2007.

TILG, H., KASER, A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest*; Jun;121(6):2126-32, 2011.

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. Commensal bacteria (normal Microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*; 93 97–108, 2004.

YU, Z., MORRISON M. Comparison of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Envionmental Microbiology*; 4800-4806,2004.

ZOETENDAL, E. G., RAJILIC-STOJANOVIC, M., DE VOS, W. M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*; 57: 1605-16-15, 2011.

ZWIELEHNER, J., LISTZ, K., HANDSCHUR, M., LASSL, C., LAPIN, A. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly. *Experimental Gerontology*; 440-446, 2009.

Anexos

Anexo 1 - Comitê de Ética (Hospital Universitário – USP)

1934 | 2009 USP 75 ANOS

30 anos hospital universitário universidade de são paulo

São Paulo, 6 de agosto de 2011.

Il^mo(a). Sr^(a).
Profa. Dra.Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas – Edifício IV
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Subprojeto de Pesquisa** "Análise da diversidade da microbiologia fecal de crianças de zero a doze meses de idade usando o método de eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE)" - **Orientadador(a):** Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez – **Pesquisador(a) Executante:** Isabel Irino Ramos Carvalho - **Registro CEP-HU/USP**: 574/05 A – **SISNEP CAAE: --**

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 5 de agosto de 2011, analisou o Subprojeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**.

Trata-se o referido Estudo de proposta de continuidade do Projeto de Pesquisa *"Flora intestinal normal da criança: desenvolvimento e características"*, aprovado por este Comitê, em 19 de agosto de 2005.

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 nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra "c".

O primeiro relatório está previsto para 5 de agosto de 2012.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

Recebi 24/08/2011
Isabel I.R. Carvalho

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-000 São Paulo – SP
Tels.: (11) 3091-9457 – Fax: (11) 3091-9479 - E-mail: cep@hu.usp.br

Anexo 2 – Comitê de Ética (Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer do CEP/FCF/49/2012
Protocolo CEP/FCF/607
CAAE: 0068.0.018.198-11

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	**Flora intestinal normal da criança: desenvolvimento e características**
Pesquisador Responsável:	**Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez**
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Patrocinadores:	FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo

O intestino do recém-nascido é estéril mas logo é colonizado por microorganismos do meio externo, principalmente os presentes no canal vaginal da mãe. As bactérias começam a aprecer nas fezes horas após o nasciomente e sua população aumenta progressivamente durante a primeira semana de vida. Mais de 99% da microbiota fecal cultivável é representda por apenas 30-40 espécies bacterianas, refletindo a dificuldade ainda existente em se conhecer toda a diversidade de microorganismos residentes no trato gastointestinal (TGI). Avanços neste campo do conhecimento foram obtidos com a utilização dos métodos moleculares, permitindo a identificação de bactérias não cultváveis. Assim, tendo em vista 1- a importância de se conhecer a microbiota humana, 2- que o estudo da microbiota humana utilizando a metagenômica é relativamente recente e é baseado, principalmente, em protocolos de estudos ambientais, e 3- a presença da diversidade de resultados encontrados na literatura, o presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes protocolos para a validação do uso da metagenômica para o estudo da microbiota intestinal, utilizando, para tanto DNA bacteriano já extraído de amostras de fezes.

Objetivos do estudo:

- Avaliar diferentes protocolos para a validação do uso da metagenômica para o estudo da microbiota intestinal humana;
- Detectar e quantificar os principais gêneros de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de 10 crianças de zero a doze meses por PCR tempo real;
- Avaliar o estabelecimento e a diversidade da microbiota bacteriana do tubo gastrintestinal de recém-nascidos humanos pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

Tipo de estudo: longitudinal

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A – Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: cepfcf@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Descrição da Casuística:
Serão utilizadas amostras de **DNA bacteriano total**, congeladas a -80 °C. Em uma primeira fase do projeto, já realizada, foram coletadas amostras de fezes das quais foram isolados o DNA bacteriano. Nesta fase, serão utilizadas essas amostras de DNA da bactéria que se encontra congeladas a -80 °C .

III – Situação do Protocolado: APROVADO em reunião de 28/05/2012.

Cabe ao pesquisador responsável:
- Comunicar ao CEP:
  - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
  - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório final (modelo do CEP).

São Paulo, 29 de maio de 2012.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: cepfcf@usp.br

Anexo 3 – Formulário de consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisa – Flora normal da criança: desenvolvimento e características
Nome do Paciente:_____
Sexo:_____Data de nascimento:_____
Responsável:_____
Endereço:_____
Fone:_____

Formulário de consentimento livre e esclarecido.

Caros pais ou responsáveis;

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

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

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

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

Pretendemos realizar a coleta de fezes através de um "swab anal", que é uma haste fina de madeira com algodão na ponta (assemelha-se ao conhecido "cotonete"), que deverá ter uma pequena porção introduzida suavemente no ânus da criança para

retirada de uma amostra de fezes. Tal procedimento não deverá provocar dor na sua criança e pode ser comparado à colocação de um supositório.

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

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

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

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

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

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

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

São Paulo,_____de_____de 20_____.