UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Detecção e quantificação de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de crianças de zero a 12 meses de idade

Silvia Toledo Talarico

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Tit. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Detecção e quantificação de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de crianças de zero a 12 meses de idade

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Silvia Toledo Talarico

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Tit. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Talarico, Silvia Toledo
T134d Detecção e quantificação de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de crianças de zero a 12 meses de idade / Silvia Toledo Talarico. -- São Paulo, 2012.
75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Martinez, Marina Baquerizo

1. Microbiologia clínica 2. Biologia molecular : Bactéria I. T. II. Martinez, Marina Baquerizo, orientador.

616.0756 CDD

Silvia Toledo Talarico

Detecção e quantificação de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de crianças de zero a 12 meses de idade

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Tit. Marina Baquerizo Martinez
orientador/presidente

Profa. Dra. Tânia Mara Ibelli Vaz
1º. examinador

Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo
2º. examinador

São Paulo, 01 de março de 2013.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Celso (*in memorian*) e Marly.
Sem todo o amor e apoio incondicional deles,
não seria capaz de alcançar todos os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me permitiu concluir mais uma etapa da minha evolução pessoal.

Aos meus pais, Celso (*in memorian*) e Marly, por darem toda a base para a minha formação como pessoa e profissional.

À Profa. Dra. Tit. Marina Baquerizo Martinez, por me aceitar como aluna e dividir todo o conhecimento, auxiliando meu crescimento pessoal e profissional. Sou grata por toda a dedicação, orientação e apoio.

À Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves, por me orientar, apoiar, aconselhar e acreditar na conclusão deste trabalho. Nosso reencontro trouxe muito aprendizado, incentivo e uma amizade que se estenderá pela vida pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Adelaide José Vaz (*in memorian*), por todos os ensinamentos na época da graduação e pelo incentivo a continuar os estudos sempre.

À Dra. Elizabeth Harummyy Takagi, pela amizade e por toda a troca de conhecimento. Foi a primeira amiga que fiz no laboratório e sempre esteve disposta a ensinar, ajudar e discutir todos os tópicos do trabalho.

À Msc. Fernanda Filomena de Oliveira e Dra. Isabel Irino, amigas do grupo da Microbiota, que me mostraram os primeiros passos na condução do trabalho e também garantiram um ambiente muito divertido de trabalho.

Aos meus queridos amigos do laboratório da FCF: Fabiana, Reneé, Hadassa, Lucas, Juliana, Milton. Com alguns de vocês, a convivência foi por pouco tempo, mas suficiente para me mostrar como é gostoso trabalhar num laboratório onde todos se apoiam, sem competição. Obrigada pelos momentos de aprendizado e diversão que tivemos.

Às minhas amigas queridas do laboratório do HU: Lilian, Juliana e Silvinha. Obrigada por todas as tardes de muito trabalho, mas também de muita ajuda, risadas e agradável convivência.

Ao Francisco (Kiko) por solucionar a construção dos gráficos em pleno feriado.

Aos meus amigos queridos das Faculdades Oswaldo Cruz: Suelly, Egidio, Jota, Jefferson, Lygia, Registila, Elda, Cristina, Jeane, Claudivânia, Rafaela, André, Drielle, José Augusto e Prof. Dr. Paulo Roberto Miele. Alguns presentes na minha vida desde a época da graduação, outros se tornaram amigos recentemente. Mas todos me apoiaram, cobriram, ouviram, aconselharam ativamente, durante toda a duração deste trabalho. Sou imensamente grata por tudo!

Às minhas amigas Aline e Stela, simplesmente por serem as irmãs que a vida me permitiu escolher e me darem meus dois sobrinhos queridos: Ian e Pedro Henrique.

Às Dra. Cristina Stewart, Ana Lucia, Lara Mendes de Almeida e Haissa por auxiliar nos experimentos e gentilmente ceder algumas cepas utilizadas no delineamento dos experimentos.

A todos que ajudaram na conclusão deste trabalho, **Muito Obrigada**!

“Comece fazendo o necessário, depois o que é possível,
e, de repente, você estará fazendo o impossível.”
São Francisco de Assis

RESUMO

TALARICO, S.T. **Detecção e quantificação de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de crianças de zero a doze meses de idade.** 2012. 75f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A sequência de eventos bacterianos que ocorre durante a colonização do trato gastrointestinal pode afetar o futuro da saúde do hospedeiro, particularmente no que diz respeito à regulação do sistema imunológico. Um entendimento claro do processo de colonização do intestino humano neonatal nos países em desenvolvimento está faltando, porque os poucos estudos disponíveis foram, em sua maioria, realizados utilizando técnicas de cultura. O objetivo deste estudo foi detectar e quantificar as bactérias dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus, Eubacterium* e *Lactococcus*, importantes componentes anaeróbios da microbiota intestinal usando PCR em tempo real. O grupo de estudo foi composto por 10 crianças, acompanhadas durante o primeiro ano de vida, vivendo em baixas condições sócio-econômicas em São Paulo, Brasil. Amostras de fezes foram avaliadas em períodos de 24 horas, 7 dias, 30 dias, 3 meses, 6 meses e 1 ano. Durante o primeiro ano de vida, há um aumento da quantidade de *Bifidobacterium* spp., quando comparada com as outras bactérias anaeróbias estudadas, com médias variando de $8,27x10^{10}$ a $2,51x10^{12}$ número de cópias de DNA/g de fezes. *Lactobacillus* spp. também foi encontrado em todos os pontos de tempo estudado, com médias variando de $4,03x10^{8}$ a $1,46x10^{10}$ número de cópias de DNA/g de fezes. *Lactococcus* spp. foi o gênero bacteriano encontrado em quantidades menores. As contagens máximas desses gêneros foram encontradas entre o terceiro e sexto mês de vida. Embora o gênero *Eubacterium* seja descrito como um dos principais membros da microbiota intestinal, este foi encontrado em amostras de apenas duas crianças. A inclusão de dieta sólida e a mudança do tipo de amamentação influenciam a composição da microbiota. No entanto, não se pode estabelecer um padrão para a presença destes micro-organismos ao longo dos meses, mostrando que a microbiota é única e está sujeita a interferências ambientais.

Palavras-chave: microbiota intestinal, bactérias anaeróbias, PCR em tempo real.

ABSTRACT

TALARICO, S.T. **Detection and quantification of anaerobic bacteria in the fecal microbiota of children aged zero to twelve months of age.** 2012. 75f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The sequence of bacterial events that occurs during the colonization of the gastrointestinal tract may affect the future health of the host, particularly with respect to the regulation of the naive immune system. A clear understanding of the colonization process of the human neonatal gut in developing countries is lacking because the few available studies were mostly performed using culture techniques. The aim of this study was to detect and quantify the bacterial genera *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* and *Lactococcus*, important anaerobic components of the intestinal microbiota using real-time PCR. The study group comprised 10 children followed during the first year of life, living in low socio-economic conditions in São Paulo, Brazil. Fecal samples were evaluated at times of 24 hours, 7 days, 30 days, 3 months, 6 months and 1 year. During the first year of life, there is an increased amount of *Bifidobacterium* spp. compared to others studied anaerobic bacteria, with averages ranging from $8,27x10^{10}$ to $2,51x10^{12}$ DNA copy number/g of feces**.** *Lacotbacillus* was also found in all studied time point, with averages ranging from $4,03x10^{8}$ to $1,46x10^{10}$ DNA copy number/g of feces. Bacterial genus *Lactococcus* is found in smaller quantities. The maximum counts of these genera were found between the third to sixth month of life. Although the genus *Eubacterium* is described as one of the leading members of the intestinal microbiota, this was found in samples of only 2 children. The inclusion of solid diet and change of type of feeding influences the composition of the microbiota, however, could not set a standard for the presence of these micro-organisms over the months, showing that the microbiota is unique and is subject to environmental interference.

Keywords: intestinal microbiota, anaerobic bacteria, real-time PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeitos da presença do butirato no intestino.	20
Figura 2	Sistema TaqMan®.	24
Figura 3	Sistema SYBR® Green I.	25
Figura 4	Padronização da curva padrão com iniciador específico para *Bifidobacterium* spp..	37
Figura 5	Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *Bifidobacterium* spp..	38
Figura 6	Padronização da curva padrão com iniciador para bactérias totais, com DNA de *E. coli* ATCC 25922.	38
Figura 7	Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador para bactérias totais, com DNA de *E. coli* ATCC 25922.	39
Figura 8	Padronização da curva padrão com iniciador específico para *Lactococcus* spp..	39
Figura 9	Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *Lactococcus* spp..	40
Figura 10	Curva de *melting* para a padronização com iniciador específico para *Lactococcus* spp..	40
Figura 11	Padronização da curva padrão com iniciador específico para *Lactobacillus* spp..	41
Figura 12	Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *Lactobacillus* spp..	41
Figura 13	Curva de *melting* para padronização com iniciador específico para *Lactobacillus* spp..	41
Figura 14	Padronização da curva padrão com iniciador específico para *E. coli.*	42
Figura 15	Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *E. coli.*	42
Figura 16	Curva de *melting* para a padronização com iniciador específico para *E. coli.*	43
Figura 17	Padronização da reação de presença/ausência com iniciador específico para *Eubacterium* spp..	54

Figura 18 Curva de *melting* da padronização da reação de presença/ausência com iniciador específico para *Eubacterium* spp.. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações de iniciadores utilizados na padronização das reações de quantificação.	31
Tabela 2	Condições da reação de quantificação por qPCR.	34
Tabela 3	Condições da reação de presença/ausência por qPCR.	36
Tabela 4	Quantificação do número de cópias de DNA/ g de fezes.	44
Tabela 5	Comparação da ausência de *Eubacterium* spp. e demais micro-organismos por qPCR.	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Quantificação dos gêneros bacterianos ao longo dos meses estudados. A) Quantificação de *Bifidobacterium* spp. B) Quantificação de *Lactococcus* spp. C) Quantificação de *Lactobacillus* spp. D) Quantificação de *Escherichia coli*.	48
Gráfico 2	Criança 1 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	48
Gráfico 3	Criança 2 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	49
Gráfico 4	Criança 3 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	49
Gráfico 5	Criança 7 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	50
Gráfico 6	Criança 8 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	50
Gráfico 7	Criança 12 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	51
Gráfico 8	Criança 13 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	51
Gráfico 9	Criança 14 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	52
Gráfico 10	Criança 15 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	52
Gráfico 11	Criança 17 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSEB	Centro de Saúde Escola Butantan
Ct	Ciclo *threshold*
DGGE	Eletroforese em gel por denaturação de gradiente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FISH	Hibridização *in situ*
HU-USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IgE	Imunoglobulina E
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PFGE	Eletroforese por campo pulsátil
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SDS	Duodecilsulfato de sódio
TGI	Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

1.	**INTRODUÇÃO**	15
2.	**OBJETIVOS**	26
2.1.	**Objetivo geral**	26
2.2.	**Objetivos específicos**	26
3.	**MATERIAL E MÉTODOS**	27
3.1.	**Amostragem**	27
3.2.	**Considerações éticas**	27
3.3.	**Extração do DNA das amostras de fezes**	28
3.3.1.	Extração do DNA das amostras de fezes coletadas em solução TE	28
3.3.2.	Extração do DNA das amostras de fezes coletadas *in natura*	29
3.4.	**Quantificação e detecção por qPCR**	31
3.4.1.	Padronização da reação de quantificação por qPCR	31
3.4.2.	Curvas padrão	31
3.4.3.	Quantificação de micro-organismos por qPCR	32
3.4.4.	Análise estatística	33
3.5.	**Prova de presença/ausência de *Eubacterium* spp. por qPCR**	35
3.5.1.	Padronização da reação de presença/ausência por qPCR	35
3.5.2.	Reação de presença/ausência por qPCR	35
4.	**RESULTADOS**	37
4.1.	**Padronização das reações de quantificação por qPCR**	37
4.2.	**Quantificação bacteriana nas amostras fecais estudadas**	43
4.3.	**Padronização da reação de presença/ausência de *Eubacterium* spp. por qPCR**	54
4.4.	**Resultados da reação de presença/ausência de *Eubacterium* spp. por qPCR**	55
5.	**DISCUSSÃO**	58
6.	**CONCLUSÃO**	64
REFERÊNCIAS		65
ANEXO – Parecer da Comissão de Ética (FCF)		74

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal humana é constituída por bactérias que vivem num complexo ambiente, onde interagem intimamente com células do hospedeiro e competem por nutrientes (CAICEDO et al, 2005). Gêneros específicos da microbiota humana são relacionados a efeitos benéficos ao hospedeiro como a modulação imunológica, resistência à colonização e contribuição a processos metabólicos e nutricionais (GARRETT; GORDON; GLIMCHER, 2010; VRIEZE et al, 2010).

O estabelecimento da microbiota intestinal é um processo influenciado por fatores internos, intrínsecos ao hospedeiro e fatores externos. Os chamados fatores externos incluem a composição da microbiota materna, a forma de nascimento (cesárea ou parto normal), contaminação ambiental, alimentação e uso de medicamentos. Os fatores internos são relacionados à fisiologia, como a anatomia do trato gastrointestinal (TGI), peristaltismo, ácidos biliares, potencial hidrogeniônico (pH) intestinal, e resposta imunológica (FANARO et al, 2003). Desta forma, a competição entre micro-organismos por receptores da mucosa e as interações entre micro-organismo e hospedeiro modulam sua composição e função, tornando a microbiota intestinal única e interpessoal.

Ao nascimento, as mucosas do recém-nascido são estéreis. A colonização ocorre progressivamente após o parto, a partir do contato com micro-organismos da microbiota materna e/ou micro-organismos presentes no ambiente (GRÖNLUND et al, 1999; MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999; PENDERS et al, 2006).

No primeiro ano de vida, a microbiota intestinal é considerada variável e instável em sua composição ao longo dos meses, pois passa da esterilidade a uma densa colonização, até se aproximar da formação semelhante a encontrada em adultos (PALMER et al, 2007; VAEL; DESAGER, 2009).

Posteriormente, a composição da microbiota se torna mais estável e a normal do adulto, chamada de comunidade clímax, é alcançada em torno dos 18 meses de idade. A partir deste período, embora a microbiota intestinal permaneça em interação permanente com micro-organismos do meio ambiente, sua composição se mantem estável (HOPKINS; SHARP; MACFARLANE, 2002).

O TGI alberga o maior número e a maior diversidade de coleções bacterianas que colonizam o corpo humano. A população microbiana no cólon é da ordem de

10^{10} a 10^{11} UFC/g de conteúdo intestinal. Mais de 99% da microbiota fecal cultivável é representada por um número de 30 a 40 espécies bacterianas, refletindo a dificuldade ainda existente em se conhecer a diversidade de micro-organismos residentes no TGI (FANARO et al, 2003; MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999).

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. Bactérias provenientes do meio ambiente, mas que não têm capacidade ou não encontram condições apropriadas para se estabelecer no TGI, são chamadas alóctones. As bactérias alóctones, portanto, raramente colonizam o intestino (LUNDEQUIST; NORD; WINBERG, 1985; THOMPSON-CHAGOYÁN; MALDONADO; GIL, 2007).

As primeiras bactérias encontradas no TGI são as anaeróbias facultativas, como as enterobactérias (representadas, principalmente, por *E. coli*) e bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*, devido a grande quantidade de oxigênio no lúmen intestinal. À medida que as bactérias facultativas se multiplicam, ocorre o consumo de oxigênio do meio, tornando-o favorável à instalação de gêneros anaeróbios, que, com o passar do tempo, passam a predominar no TGI. Entre as bactérias anaeróbias encontradas no intestino são encontrados, principalmente, os gêneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, entre outros (FINEGOLD, 1977; THOMPSON-CHAGOYÁN; MALDONADO; GIL, 2007; VAEL; DESAGER, 2009).

Depois de instalada a microbiota intestinal, por volta dos 18 aos 24 meses, as bactérias anaeróbias representam 97% da sua composição, sendo considerada saudável a microbiota que apresente grande participação das bifidobactérias e dos lactobacilos (MORAIS; JACOB, 2006).

A mucosa intestinal humana é a principal interface entre o sistema imunológico e o ambiente externo e sua microbiota tem efeito estimulante no desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro. Este efeito estimulante está envolvido em aspectos da resistência, importantes nos estágios iniciais das infecções pelos patógenos. No TGI existe um estado de modulação imunológica constante, pois 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 (MOUNTTZOURIS; MCCARTNEY; GIBSON, 2002; SCHIFFRIN; BLUM, 2002; WINKLER et al, 2007).

Além da ativação imunológica, a microbiota desempenha papéis importantes na proteção ecológica do hospedeiro. A resistência à colonização ou efeito barreira, impede a colonização por bactérias patogênicas, e pode acontecer por produção de substratos que inibiriam o crescimento das bactérias patogênicas (antagonismo), competição por nutrientes e competição por sítios de adesão (TANNOCK, 2001; WINKLER et al, 2007).

Outra função atribuída a microbiota intestinal está relacionada à sua contribuição para a nutrição e metabolismo do hospedeiro, que pode ser evidenciada, por exemplo, por aumentar a capacidade de digestão de polissacarídeos da dieta, interferir na motilidade e pH intestinal, favorecendo a absorção de íons e água (HOOPER; MACPHERSON, 2010; MORAIS; JACOB, 2006; WALL et al, 2008).

Apesar de todos os efeitos benéficos, existem evidências do envolvimento da microbiota (ou da desregulação da mesma) em certos estados patológicos, como processos alérgicos, obesidade, doença inflamatória intestinal e o câncer colônico, entre outros (KOVATCHEVA-DATCHARY et al, 2009; THOMPSON-CHAGOYÁN; MALDONADO; GIL, 2007).

Entre os anaeróbios, alguns bacilos Gram-positivos, como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., representam as principais bactérias benéficas, sendo algumas espécies chamadas de probióticas. São micro-organismos que auxiliam a manutenção de um balanço saudável da microbiota intestinal, por produzirem compostos orgânicos decorrentes da atividade fermentativa, que inibem a multiplicação de bactérias com potencial de dano ao epitélio intestinal. São, também, capazes de contribuir para a redução da alergenicidade das proteínas, minimizando o risco de alergia alimentar, além de estimular a produção de ácidos graxos de cadeia curta e muco, contribuindo para a eficácia do papel de barreira da mucosa intestinal (DE MELLO et al, 2009; MORAIS; JACOB, 2006; HAARMAN; KNOL, 2006).

As bifidobactérias são micro-organismos que não apresentam nenhum fator de patogenicidade para o homem. Alguns fatores, como a presença de oligossacarídeos não absorvíveis no leite materno, conhecidos como fatores bifidogênicos, são substâncias prebióticas e favorecem a implantação destas bactérias no TGI dos recém-nascidos (EDWARDS; PARRET, 2002; MORAIS; JACOB, 2006).

Prebióticos são definidos como substâncias não digeríveis presentes nos alimentos que estimulam seletivamente o crescimento e atividade de bactérias no cólon e trariam efeitos benéficos ao hospedeiro. O consumo de substâncias prebióticas, hoje, é utilizado para a modificação da microbiota intestinal. Em fórmulas para crianças, combinações específicas de prebióticos como galacto-oligossacarídeos e fruto-oligossacarídeos, são consideradas estimulantes do crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, assim como os oligossacarídeos presentes no leite materno (HAARMAN; KNOL, 2006).

Estudos mostram que algumas doenças que acometem o TGI, como doença inflamatória intestinal, doença de Cronh e até diabetes tipo 2 em adultos envolvem as interações entre microbiota, desenvolvimento da imunidade de mucosas e susceptibilidade do hospedeiro. Nesses processos patológicos, presença de bactérias probióticas como as bifidobactérias e os lactobacilos é menor em relação a outras bactérias, quando comparadas com sua presença em indivíduos saudáveis (LARSEN et al, 2010; MARTEAU et al, 2004; OUWEHAND; ISOLAURI; SALMINEN, 2002).

No Brasil, assim como em outros países, já existem relatos de diminuição de casos de morte de crianças por diarreia (tanto viral quanto bacteriana), devido ao uso de probióticos, mostrando os efeitos benéficos da presença de *Lactobacillus* spp. reduzindo o tempo da doença e a desidratação. A incidência de processos alérgicos alimentares também é reduzida em crianças que apresentam uma grande quantidade de bifidobactérias e lactobacilos em sua microbiota intestinal, pois mecanismo de defesa mediados por imunoglobulina E (IgE) são estimulados (BENGMARCK, 2002; MORAIS; JACOB, 2006).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* (bacilos Gram-positivos), também caracterizados como bactérias ácido-lácticas, são bactérias probióticas, que assim como *Bifidobacterium* spp., são utilizadas na indústria alimentícia na produção, entre outros produtos, de leites fermentados. São micro-organismos considerados seguros, sem trazer riscos para a saúde humana e ambiente. Porém, alguns estudos mostram que essas bactérias ácido-lácticas podem apresentar alguns fatores de virulência, entre eles, mecanismos de resistência a antimicrobianos, que podem, inclusive, ser transferidos para bactérias da microbiota ou bactérias patogênicas transitoriamente residentes no hospedeiro (KLARE et al, 2007).

Entre as bactérias benéficas, o gênero *Eubacterium* também já foi descrito como importante componente da microbiota humana. Entretanto, estes bacilos irregulares Gram-positivos, são considerados oportunistas, mesmo não sendo a causa primária de algumas doenças infecciosas onde já foi relatada a sua presença. Podem produzir esporos, fazendo com que o gênero seja classificado em *clusters* com espécies de *Clostridium* spp. (MAUKONEN; SAARELA, 2011).

São bactérias capazes de produzir vitaminas K e do complexo B e os ácidos graxos de cadeia curta, em particular o butirato, também produzido por outros componentes da microbiota, como *Faecalibacterium* spp., encontrado principalmente em adultos. Trazem um efeito importante na saúde do cólon, protegendo contra o câncer, colites ulcerativas e promovendo o desenvolvimento normal das células do epitélio colônico. Dada a importância do butirato para o metabolismo do epitélio colônico, assume-se que as bactérias produtoras de butirato são toleradas pelo sistema imune inato (figura 1) (CANNY; MCCORMICK, 2008; GUILLOTEAU et al, 2010; JOST et al, 2012; MAUKONEN et al, 2006; MAUKONEN; SAARELA, 2011).

Devido a presença de produtos ácidos, originados de processos fermentativos, o pH luminal é, aproximadamente, 5,5. Este ambiente levemente acidificado permite a competição entre as bactérias produtoras de butirato e bactérias que utilizam carboidratos, como *Bacteroides* spp., além de estimular a produção de butirato. A diminuição desse pH, dificulta a permanência de bactérias do gênero *Eubacterium*, utilizadoras de lactato, e com isso, permitem acúmulo de ácido láctico (GUILLOTEAU et al, 2010).

A presença de butirato no cólon intestinal leva a modificação da microbiota. Os substratos butirogênicos levam a modulação da população microbiana colônica, induzindo a multiplicação de espécies produtoras de butirato e permitindo um equilíbrio entre a presença de *Eubacterium* spp. e *Bifidobacterium* spp.. Processos metabólicos de *cross-feeding,* também levam à manutenção da presença destes micro-organismos, através da produção de substâncias utilizadas pelas bactérias, garantindo um equilíbrio entre a presença destas. Bactérias produtoras de butirato são capazes de fermentar produtos do metabolismo de oligossacarídeos produzidos por bifidobactérias. Produtos intermediários de processos fermentativos de bifidobactérias da microbiota, como lactato, por exemplo, são encontrados em

baixas concentrações em indivíduos saudáveis, pois são metabolizados por *Eubacterium* spp. (GUILLOTEAU et al, 2010).

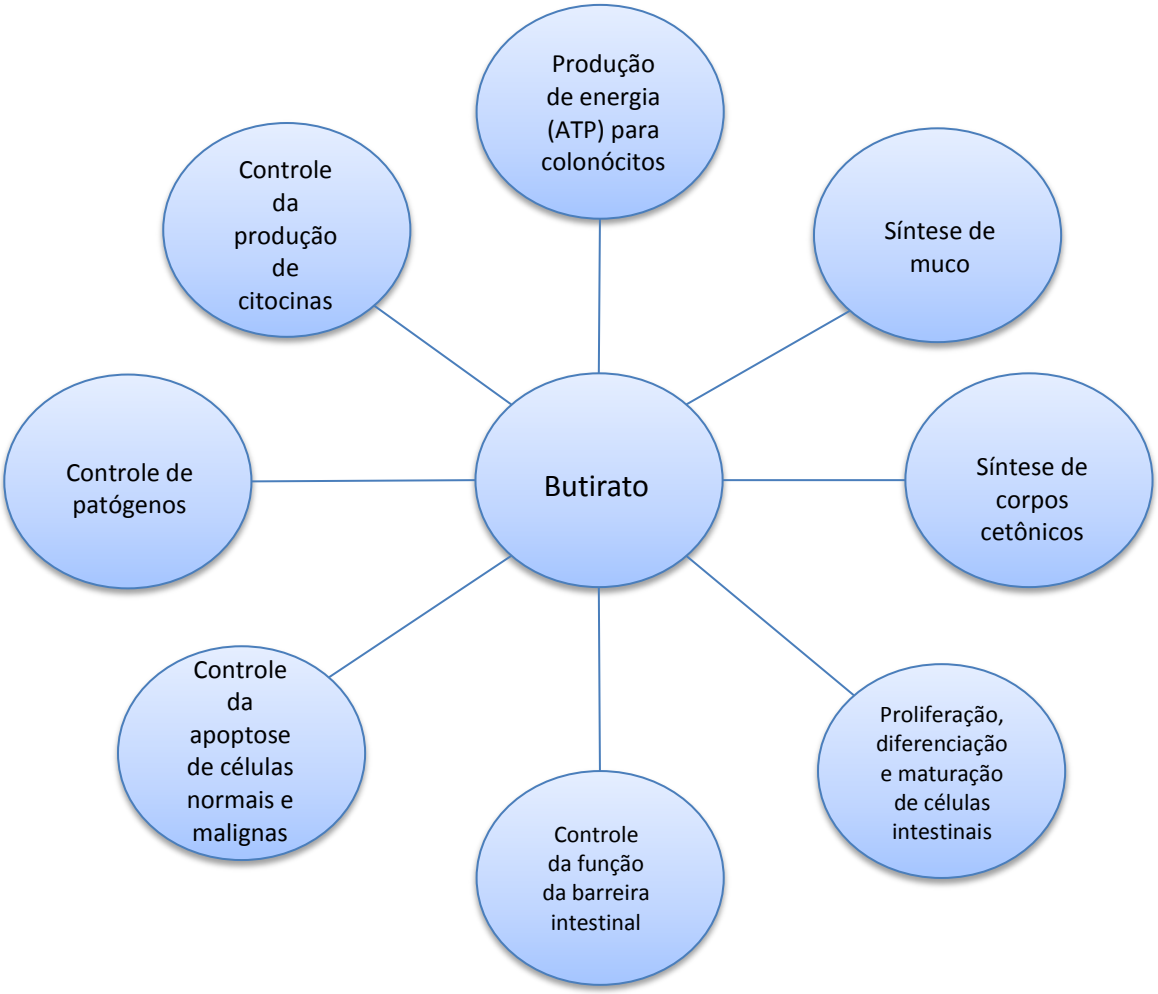


Figura 1: efeitos da presença do butirato no intestino (GUILLOTEAU et al, 2010).

Como forma de auxiliar a instalação da microbiota intestinal pelo uso de pré e probióticos durante o período de colonização intestinal tem sido sugerida. Entretanto, ressalta-se a importância de se conhecer mais profundamente como ocorre a instalação da microbiota e quais as consequências, a longo prazo, de possíveis intervenções neste processo (EDWARDS; PARRET, 2002).

A utilização de técnicas moleculares tem revelado uma grande diversidade da microbiota nas amostras analisadas, permitindo também a identificação de bactérias não cultiváveis. Análises filogenéticas baseadas em reações de polimerase em cadeia (PCR) (clones estratégicos) têm sido utilizadas para caracterizar microbiota

de fezes humana. A biblioteca de 16S *rRNA* (ácido ribonucleico ribossomal) vem demonstrando ser uma ótima técnica molecular para evidenciar a composição da microbiota intestinal (FURRIE, 2006; GASKINS et al, 2008; HAYASHI et al, 2003).

Ribossomos procariotos contêm duas subunidades, 50S e 30S. A subunidade 50S contém 34 proteínas e as moléculas de *rRNA* 5S e 23S *rRNA*. A subunidade 30S contém 21 proteínas e a molécula de *rRNA* 16S. O *rRNA* 16S tem sido a molécula mais amplamente empregada para desenvolver a filogenia dos procariotos (BLAUT et al, 2002).

O gene *rRNA* tem regiões de consenso que são identificadas por todas as bactérias e regiões de variabilidade que são específicas de grupos e espécies particulares. Dentro destas regiões variáveis há também pequenas áreas de hipervariabilidade que podem ser únicas para diferentes cepas de um mesmo organismo. Portanto, a sequência do gene que codifica o *rRNA* pode ser usada para identificar espécies diferentes e cepas de espécie particular dentro de uma comunidade bacteriana mista complexa usando tecnologia em série (FURRIE, 2006).

Estudos anteriores mostram a dificuldade de identificação de alguns gêneros bacterianos pela técnica de PCR clássico, como por exemplo, *Bifidobacterium* spp. (MATHYS et al, 2008), *Lactobacillus* spp. e *Eubacterium* spp..

Os resultados anteriores de um estudo conduzido em nosso laboratório, da microbiota fecal das 10 crianças até 1 ano avaliadas neste trabalho, por biblioteca genômica 16S *rRNA*, mostraram que não ocorre a detecção de micro-organismos dos gêneros *Bifidobacterium* e *Eubacterium*, e o gênero *Lactobacillus* tem sido detectado em baixas porcentagens. Interessantemente, as bactérias anaeróbias dos gêneros *Bacteroides* e *Clostridium* são detectadas com frequência, como já descrito na literatura. A razão para estes achados ainda é desconhecida (BRANDT et al, 2012).

Uma das possíveis explicações para a não detecção de *Bifidobacterium* spp., um dos principais anaeróbios encontrados no trato gastrointestinal, seja uma falha metodológica, uma vez que o DNA deste gênero bacteriano possui grandes porcentagens de citosina-guanina e a denaturação e pareamento dos iniciadores na reação de PCR são prejudicados, falhando, desta forma, a amplificação do gene 16S *rRNA* de bifidobactérias (HAYASHI et al, 2003).

Outra explicação para a falha da detecção de *Bifidobacterium* spp., por meio da técnica de biblioteca genômica 16S *rRNA*, é a existência de falhas no anelamento, em pelo menos 3 regiões, com o gene 16S *rRNA*, ao analisar sequências de iniciadores considerados universais para bactérias (SIPOS et al, 2007).

Além de biblioteca genômica, outras técnicas moleculares são utilizadas na identificação de micro-organismos da microbiota, cuja determinação por cultura ou identificação bioquímica é difícil, por exemplo, DGGE (eletroforese em gel por denaturação de gradiente), hibridização *in situ* (FISH), ribotipagem, eletroforese por campo pulsátil (PFGE) (FURRIE, 2006; MATSUKI et al, 2002; MOUNTZOURIS; MCCARTNEY; GIBSON, 2002).

O uso dos métodos moleculares traz algumas vantagens na identificação da população intestinal, pois são técnicas de alta especificidade, realizadas em um tempo mais curto que a maior parte das metodologias convencionais de identificação e quando combinadas as técnicas, além de identificar as bactérias, inclusive as espécies não cultiváveis, é possível quantifica-las. As amostras podem ser congeladas para posterior análise (FURRIE, 2006).

Apesar das vantagens apresentadas, as técnicas moleculares são caras e difíceis de padronizar. Dependem da extração adequada de material genético e nem sempre os métodos apresentam uma boa sensibilidade (FURRIE, 2006).

A técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) é a metodologia de escolha para a confirmação quantitativa desses ensaios e pode ser usada para determinar o número de bactérias específicas, através da utilização de iniciadores desenhados para reconhecer regiões específicas do gene 16S *rRNA*. Esta técnica tem se mostrado mais sensível que o PCR clássico, inclusive por detectar células bacterianas por grama de amostra fecal em concentrações menores que na técnica convencional (FURET et al, 2009; FURRIE, 2006; MATSUKI et al, 2004; MATHYS et al, 2008).

Durante a progressão da reação, os dados são coletados ao longo dos ciclos, e não apenas no final da reação, modificando a abordagem da quantificação de DNA e RNA pela PCR. A qPCR utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez. Quanto mais alto o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência. A técnica de qPCR apresenta 2 sistemas de detecção

de sequências: o sistema TaqMan® e o sistema do corante SYBR® Green I (APPLIED a).

O sistema TaqMan® (figura 2), também chamado de ensaio para nuclease 5' fluorescente, faz uso de uma sonda fluorescente que possibilita a detecção de um produto específico da PCR, conforme seu acúmulo durante os ciclos da reação. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* por meio da transferência de energia por ressonância de fluorescência pelo espaço. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos iniciadores e é clivada pela ação da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o iniciador é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal do corante *reporter*. A clivagem também remove a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do iniciador continue até o final da fita molde, evitando que a inclusão da sonda iniba o processo da PCR. Moléculas adicionais do corante *reporter* são clivadas de suas respectivas sondas em cada ciclo, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de *amplicon* produzido (APPLIED a).

Existem 2 tipos de sondas TaqMan®: as sondas TaqMan® com corante TAMRA™ como o corante *quencher* e as sondas TaqMan® MGB, que são menores e mais precisas, pois o *quencher* não emite flourescência, diminuindo a interferência (APPLIED a).

O sistema TaqMan® apresenta algumas vantagens: o sinal fluorescente só é gerado quando ocorre hibridização específica entre a sonda e o alvo. As sondas podem ser marcadas com corantes *reporter* diferentes, o que permite a amplificação de sequências distintas em um único tubo de reação, além da eliminação do pós-processamento da PCR, reduzindo tempo de análise. A possibilidade de utilização de sondas distintas é também a principal desvantagem da técnica, pois há a necessidade de síntese de diferentes sondas e o custo deste procedimento é elevado (APPLIED a).

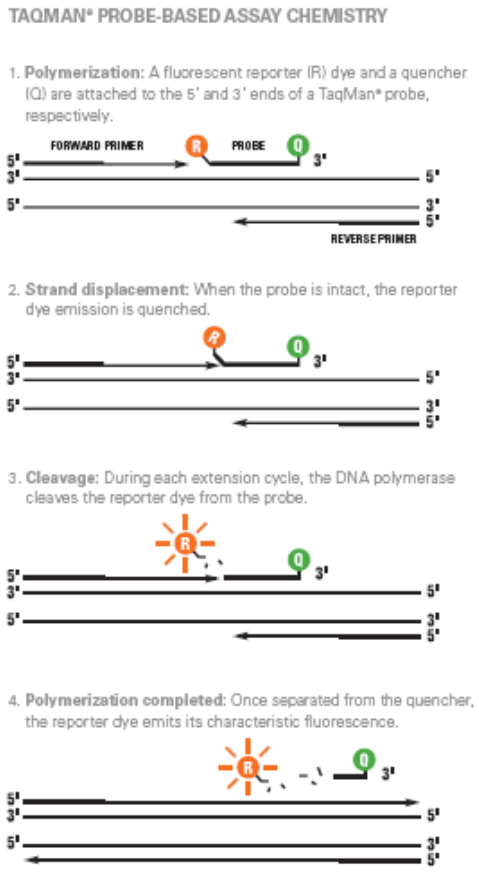


Figura 2: sistema TaqMan® (APPLIED a).

O sistema SYBR® Green I (figura 3) utiliza o corante que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação. A diferença mais importante entre os sistemas SYBR® Green I e TaqMan® é que o primeiro detectará todo DNA dupla-fita, inclusive produtos de reação não específicos. Quando o corante SYBR® Green I é adicionado à amostra, ele imediatamente se liga a todo DNA dupla-fita presente na amostra e conforme a DNA Polimerase AmpliTaq Gold® amplifica a sequência alvo, criando *amplicons* o corante SYBR® Green I se liga a cada nova cópia de DNA dupla-fita, resultando no aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR (APPLIED a).

Este sistema pode ser utilizado para monitorar a amplificação de qualquer sequência de DNA dupla-fita e dispensa a utilização de sonda, reduzindo a configuração do ensaio e os custos de execução. Porém, a principal desvantagem do sistema é a geração de sinais falso-positivos, ou seja, ele também pode se ligar a

sequências não específicas de DNA dupla-fita uma vez que a molécula de SYBR® Green I se liga a qualquer DNA dupla-fita (APPLIED a).

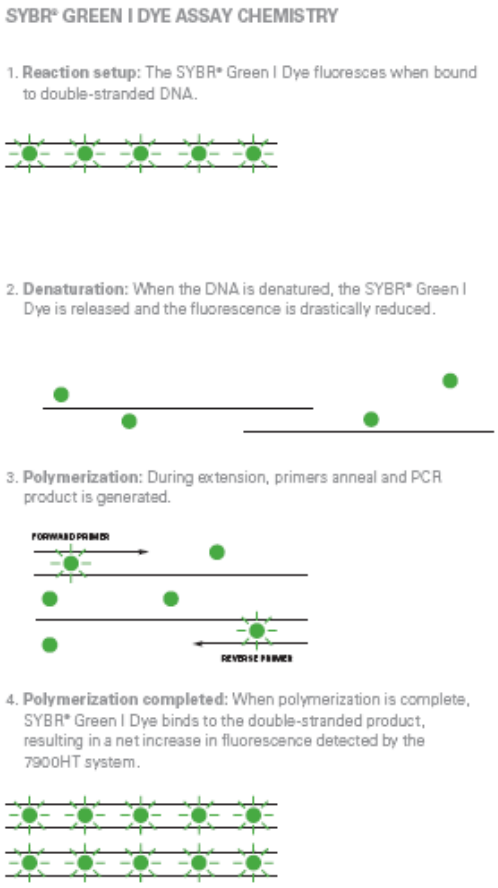


Figura 3: sistema SYBR® Green I (APPLIED a).

A técnica de qPCR é aplicada com sucesso na quantificação de DNA bacteriano em diversas amostras, inclusive de fezes (RINTTILÄ et al, 2004). Por esta razão, para analisarmos a real participação de bactérias anaeróbias na comunidade microbiana intestinal, deste grupo de crianças previamente estudadas, escolhemos esta metodologia para detectar e quantificar essas bactérias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Detectar e quantificar alguns dos principais gêneros de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de 10 crianças de zero a doze meses.

2.2. Objetivos específicos:

- Detectar e quantificar os seguintes gêneros de micro-organismos anaeróbios Gram-positivos nas amostras de fezes das 10 crianças:

- *Bifidobacterium* spp.
- *Lactobacillus* spp.
- *Lactococcus* spp.
- *Eubacterium* spp.

- Detectar e quantificar *E. coli*, nas amostras de fezes das 10 crianças.

- Quantificar a totalidade de bactérias nas amostras de fezes das 10 crianças.

- Determinar relação entre presença dos micro-organismos e alimentação, uso de antimicrobianos e ambiente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Foram estudadas neste trabalho as amostras de fezes obtidas de bebês nascidos a termo, de parto normal, no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) e acompanhados no Centro de Saúde Escola Butantan (CSEB). Foram avaliadas as amostras coletadas nos seguintes intervalos de tempo:

- 24 horas
- 7 dias
- 30 dias
- 3 meses
- 6 meses
- 12 meses

As amostras de fezes de 24 horas foram coletadas no Alojamento conjunto do HU. As demais amostras foram coletadas em casa, pelas respectivas progenitoras, após evacuação recém emitida, diretamente das fraldas, e acondicionadas em recipiente estéril, o qual foi mantido sob congelamento até o momento da entrega no CSEB.

Após a entrega do material, as fezes foram mantidas a -20°C no CESB e, então, enviadas ao Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo onde foram mantidas a -80°C até o momento do uso.

3.2. Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. As mães foram informadas sobre os objetivos da

pesquisa, os métodos de investigação empregados e da necessidade de acompanhamento periódico de suas crianças. Após esclarecimento verbal, foi fornecido termo de consentimento livre e esclarecido.

Não houve risco previsível em relação ao estudo, nem prejuízo para os indivíduos envolvidos no mesmo.

Toda necessidade da criança durante o período do estudo, no que se refere ao uso de medicamentos e eventuais mudanças dietéticas foram respeitadas e registradas nos prontuários mensais de cada criança.

3.3. Extração do DNA das amostras de fezes

No início das coletas de fezes, em projeto anterior (BRANDT et al, 2012), seguiu-se protocolo de preparo de amostras proposto por McOrist; Jackson e Bird (2002), com suspensão inicial das fezes em solução TE e posterior extração de DNA com uso do kit QiaAmp DNA Stool. Porém, com o início das atividades de extração, verificou-se que o rendimento na recuperação de DNA estava bem aquém do esperado, e, então desta forma, as fezes passaram a ser coletadas e mantidas *in natura*, sob refrigeração, a -80°C até o momento do uso. Desta forma, o DNA das amostras de fezes das 10 crianças foi obtido através de duas metodologias diferentes. Amostras que representam os intervalos de tempo de 24h, 7 dias e 30 dias foram obtidas a partir de coleta pós evacuação e suspensas em solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6) e o DNA extraído com protocolo proposto por Ausubel et al. (1999), descrito a seguir. As amostras de 3, 6 e 12 meses foram obtidas a partir de coleta pós-evacuação e mantidas *in natura*, sob refrigeração, até o momento da entrega no CSEB e o DNA foi obtido por extração por kit.

3.3.1. Extração do DNA das amostras de fezes coletadas em solução de TE

A obtenção do DNA do material fecal que foi suspenso em solução de TE (Tris-HCl 10mM/ EDTA 50mM) foi feita de acordo com Ausubel et al. (1999), com

algumas modificações a saber: 576μL da amostra de fezes foram aliquotados em um microtubo estéril e homogeneizados com 30μL de duodecilsulfato de sódio 10% (SDS), aquecido previamente em banho-maria a 37°C. A essa mistura adicionou-se 6μL de Proteinase K (20mg/mL) e, após homogeneização em *vortex*, a amostra foi incubada a 37°C, em banho-maria, por 2h. Após a incubação, adicionou-se 100μL de NaCl 5M e o tubo foi homogeneizado, delicadamente, com as mãos. Em seguida, adicionou-se 80μL de CTAB/NaCl (CTAB 10%/0,7M NaCl – CTAB= *hexadecyltrimethylammonium bromide*), aquecido previamente em banho-maria, a 37°C, e o tubo foi incubado a 65°C, em banho-maria, por 10 minutos. Após o período de incubação, adicionou-se 720μL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O tubo foi homogeneizado no *vortex* e centrifugado a 16000g, por 5 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, 650μL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo estéril e, adicionado a este o mesmo volume da solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após a homogeneização no *vortex*, o tubo foi centrifugado, a 16000g, por 10 minutos, a 4°C. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, com exceção da etapa de centrifugação. No gelo, foram transferidos 650μL do sobrenadante para um novo microtubo estéril e adicionados 390μL de isopropanol. Após homogeneização delicada do tubo com as mãos, até precipitação do DNA, este foi centrifugado a 14000rpm, por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, vertendo o conteúdo do tubo, e adicionado ao sedimento 1mL de etanol 70% gelado. O tubo foi centrifugado a 14000rpm, por 10 minutos, a 4°C. Mais uma vez foi descartado o sobrenadante, vertendo o conteúdo do tubo. Após secagem *overnight*, o foi DNA ressuspendido em 100μL de água MilliQ® estéril e incubado a 37°C, em banho-maria, por 1hora para completa homogeneização e quantificado no equipamento Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific). Até o momento do uso, o tubo foi mantido a -20°C.

3.3.2. Extração do DNA das amostras de fezes coletadas *in natura*

O DNA das amostras coletadas *in natura* foi obtido utilizando o *kit QIAmp DNA Stool Mini* (Qiagem) para o isolamento de DNA genômico bacteriano das

amostras de fezes, de acordo com as recomendações do fabricante, Furet et al. (2009) e McOrist; Jackson e Bird (2002) com algumas modificações, a saber: 0,2g de fezes foram aliquotados em um microtubo estéril. A este tubo, 10 pérolas de vidro pequenas estéreis foram adicionadas, próximo à chama do bico de Bunsen. Em seguida, foram adicionados 1,4mL de tampão ASL e a homogeneização total foi feita em *vortex*, por 1 minuto. O tubo foi incubado em banho-maria fervente, por 10 minutos, homogeneizado em *vortex* por 15 segundos e centrifugado a 15000rpm, por 2 minutos. Para um novo microtubo estéril, 1,2mL do sobrenadante foram transferidos e o *pellet* foi descartado. A este tubo foi adicionado 1 comprimido Innibitex e imediatamente ocorreu a homogeneização no *vortex*, por 1 minuto ou até o comprimido dissolver completamente. Este tubo foi incubado à temperatura ambiente, por 1 minuto e centrifugado a 15000rpm, por 6 minutos. Todo o volume do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril e o *pellet* foi descartado. O tubo contando o sobrenadante transferido foi centrifugado a 15000rpm, por 6 minutos. Em um novo microtubo estéril, pipetou-se 15μL de proteinase K e para este tubo transferiu-se 200μL do sobrenadante do tubo centrifugado, 200μL de tampão AL e a homogeneização em *vortex* foi feita por 15 segundos. O tubo foi incubado a 70°C, em banho-maria, por 10 minutos. Ao lisado, adicionou-se 200μL de etanol P.A. e o tubo foi homogeneizado em *vortex*. O lisado foi transferido para uma coluna (disponível no kit), identificada na tampa, e centrifugado a 15000rpm, por 2 minutos. O tubo coletor foi trocado por outro disponível com o kit. Cuidadosamente, a tampa da coluna foi aberta e adicionou-se 500μL de tampão AW1. Fechou-se a tampa e a coluna foi centrifugada por 2 minutos, a 15000rpm. Este passo foi repetido, mas agora pipetando 500μL de tampão AW2 e trocando o tubo coletor. O tubo coletor foi trocado mais uma vez e a coluna foi centrifugada a 15000rpm, por 1 minuto, para remover possíveis resíduos dos tampões da coluna. A coluna foi transferida para um novo microtubo estéril, identificado na lateral e acrescentados 200μL de tampão AE na coluna. Após incubação à temperatura ambiente, por 1 minuto o tubo foi centrifugado a 15000rpm, por 2 minutos. A quantificação foi feita no equipamento Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific) e tubo foi mantido a -20°C até o momento do uso.

3.4. Quantificação e detecção por qPCR

3.4.1. Padronização da reação de quantificação por qPCR

A padronização das reações de quantificação foi realizada para se determinar as concentrações ideais de iniciadores, através da combinação de diferentes concentrações de iniciadores *foward* e *reverse* (Tabela 1), a fim de se obter uma eficiência entre 90% e 110%, além de otimizar a reação para um volume final de 20μL. Para as reações de sistema TaqMan®, a concentração de sonda foi mantida em 250nM durante todas as reações de padronização, de acordo com orientações do fabricante do aparelho. A eficiência da amplificação é o valor no qual um *amplicon* é gerado. Quanto mais próximo de 100% a eficiência da reação estiver, melhor o desempenho do ensaio. A eficiência é calculada pelo software 7500 Software Version 2.0.5 Applied Biosystems, Life Technologies Corp., 2010.

Tabela 1 – Concentrações de iniciadores utilizados na padronização das reações de quantificação

Iniciador *reverse* / Iniciador *foward*	50nM	300nM	900nM
50nM	50/50	50/300	50/900
300nM	300/50	300/300	300/900
900nM	900/50	900/300	900/900

3.4.2. Curvas padrão

Para obter o DNA bacteriano utilizado na construção da curva padrão das bactérias a serem quantificadas, alíquotas de 1mL da fase log de crescimento

desses micro-organismos foram utilizadas para a extração do DNA genômico com o *Kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante (FURET et al, 2009).

As bactérias anaeróbias (*Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019 e *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356) foram inoculadas em caldo Lactobacilli MRS (Difco) e incubadas por 24h, em anaerobiose, a 37°C. Para crescimento de *E. coli* ATCC 25922, foi utilizado o caldo Luria-Bertani (LB) preparado no laboratório, incubado por 24h, em aerobiose, a 37°C.

Diluições seriadas de uma concentração conhecida de DNA genômico de cada espécie a ser quantificada foram usadas na construção da curva padrão. As curvas padrão foram construídas para cada um dos micro-organismos estudados e como controle negativo, foi utilizada água estéril MilliQ®.

Para a quantificação de bactérias totais, o DNA de *E. coli* ATCC 25922 foi eleito para a construção da curva padrão, uma vez que que o número de cópias do gene 16S *rRNA* deste gênero bacteriano é conhecido (LEE; LEE; SHIN, 2008; ZHANG; SHAO; FANG, 2009).

Para a quantificação das bactérias anaeróbias foram utilizadas as seguintes bactérias para construção das curvas: *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

3.4.3. Quantificação de micro-organismos por qPCR

As reações de quantificação por qPCR foram realizadas em equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para a quantificação da população total bacteriana e *Bifidobacterium* spp. foi utilizado o sistema TaqMan® e para quantificar *E. coli* e os gêneros anaeróbios *Lactococcus* e *Lactobacillus* foi utilizado o sistema SYBR® Green I. A relação de iniciadores e sondas utilizados encontra-se descrita na Tabela 2 (FURET et al, 2009; RINTTILÄ et al, 2004).

O volume total final de reação foi determinado em 20μL, sendo 2μL de DNA extraído de fezes conforme descrição anterior e o volume restante composto por mix, iniciadores e sondas (FURET et al, 2009).

Para as reações utilizando o sistema TaqMan®, as condições de amplificação foram: denaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. Para o sistema SYBR® Green I as reações foram realizadas nas mesmas condições de amplificação, seguidas da curva de *melting* (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C).

3.4.4. Análise estatística

Os cálculos de quantificação das amostras foram realizados no programa Excel, com o valor do ciclo *threshold* (Ct) obtido durante as corridas. Estes valores foram colocados na equação da reta obtida a partir da curva padrão construída. Os valores obtidos foram corrigidos de acordo com a diluição das amostras (ALTERMANN et al, 2005; BARRANGOU et al, 2009; BOLOTIN et al, 2001; DURFEE et al, 2008).

O número de cópias das espécies bacterianas foi calculado para cada amostra de fezes, a partir dos valores de Ct, utilizando as curvas padrão construídas. (ZHANG; SHAO; FANG, 2009)

Para calcular o número de cópias foi utilizada a seguinte fórmula (APPLIED b):

nº de cópias = DNA(g) /cópia genoma (g)

onde:

cópia genoma(g) = tamanho genoma (nt)*1,096.10^{-21}(g/bp)

Tabela 2 – Condições da reação de quantificação por qPCR

Organismo	**Iniciadores e sondas**	**Sequências (5' – 3')**	**Referências**	**Concentração**	**Sistema**	**Condições da reação**
Bactérias totais	F_Bact 1369 R_Prok 1492 P_TM 1389F	CGG TGA ATA CGT TCC CGG TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T 6FAM-CTT GTA CAC ACC GCC CGT C	FURET et al, 2009	200nM 200nM 250nM	TaqMan®	denaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C
Bifidobacterium	F_Bifid 09c R_Bifid 06 P_Bifid	CGG GTG AGT AAT GCG TGA CC TGA TAG GAC GCG ACC CCA 6FAM-CTC CTG GAA ACG GGT G	FURET et al, 2009	300nM 300nM 250nM		
E. coli	E. coli F E. coli R	CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA CGG GTA ACG TCA ATG AGC AAA	FURET et al, 2009	50nM 900nM	SYBR® Green I	denaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C, seguidos da curva de *melting* (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C)
Lactobacillus	Lactobacillus F Lactobacillus R	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A CAC CGC TAC ACA TGG AG	RINTTILÄ et al, 2004	300nM 300nM		
Lactococcus	Llac05-F Llac02-R	AGC AGT AGG GAA TCT TCG GCA GGG TAG TTA CCG TCA CTT GAT GAG	FURET et al, 2009	300nM 900nM		

3.5. Prova de presença/ausência de *Eubacterium* spp. por qPCR

3.5.1. Padronização da reação de presença/ausência por qPCR

A padronização da reação de presença/ausência foi realizada para determinar as concentrações ideais de iniciadores (Tabela 1), além de otimizar a reação para um volume final de 20μL. A curva de *melting* foi utilizada para mostrar a especificidade da dissociação dos iniciadores entre o controle positivo e amostras

Como controle positivo para a presença da bactéria foi utilizado um clone de *Eubacterium limosum,* obtido a partir de clonagem de uma amostra e confirmado por sequenciamento, em estudo anterior com as amostras das mesmas crianças, realizado em nosso laboratório, uma vez que, por problemas na importação, não foi possível obter a cepa ATCC para utilização como controle positivo, e água estéril MilliQ® como controle negativo.

3.5.2. Reação de presença/ausência por qPCR

A prova de presença/ausência para detecção de bactérias do gênero *Eubacterium* por qPCR real foi realizada em equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para a detecção de *Eubacterium* spp. foi utilizado o sistema SYBR® Green I. A relação de iniciadores utilizados encontra-se descrita na Tabela 3 (MAUKONEN; SAARELA, 2011).

O volume total final de reação foi determinado em 20μL, sendo 2μL de DNA extraído de fezes conforme descrição anterior e o volume restante composto por mix e iniciadores (FURET et al, 2009).

Para as reações utilizando o sistema SYBR® Green I, as condições de amplificação foram: denaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C, seguidas da curva de *melting* (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C).

Tabela 3 – Condições da reação de presença/ausência por qPCR

Organismo	**Iniciadores**	**Sequências (5' – 3')**	**Referência**	**Concentração**	**Sistema**	**Condições da reação**
Eubacterium	LIMO-F LIMO-R	TGG ATC CTT CGG GTG ACA TT CTC ATT GGG TAC CGT CAT TC	MAUKONEN; SAARELA, 2011	300nM 300nM	SYBR® Green I	denaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C, seguidos da curva de *melting* (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C)

4. RESULTADOS

4.1. Padronização das reações de quantificação por qPCR

Primeiramente, foram padronizadas as reações de quantificação com os iniciadores para quantificação dos gêneros anaeróbios *Bifidobacterium, Lactobacillus* e *Lactococcus*, além de *E. coli* e bactérias totais, construindo curvas padrão. A concentração dos iniciadores foi determinada para atingir uma eficiência entre 90 e 110% e a reação otimizada para um volume final de 20μL, sendo 2μL de amostra.

A padronização da reação de quantificação para o gênero *Bifidobacterium* foi realizada utilizando sistema TaqMan® (figuras 4 e 5) e permitiu definir as concentrações de iniciadores em 300nM, tanto para *foward* quanto *reverse* e 250nM para a sonda com *reporter* FAM e *quencher* NFQ-MGB, pois nessas condições, a eficiência da reação foi de 90,516%. Foram usadas 5 diluições decimais seriadas de DNA genômico de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019 na construção da curva padrão. O ponto inicial da curva teve concentração de 5,3ng/μL.

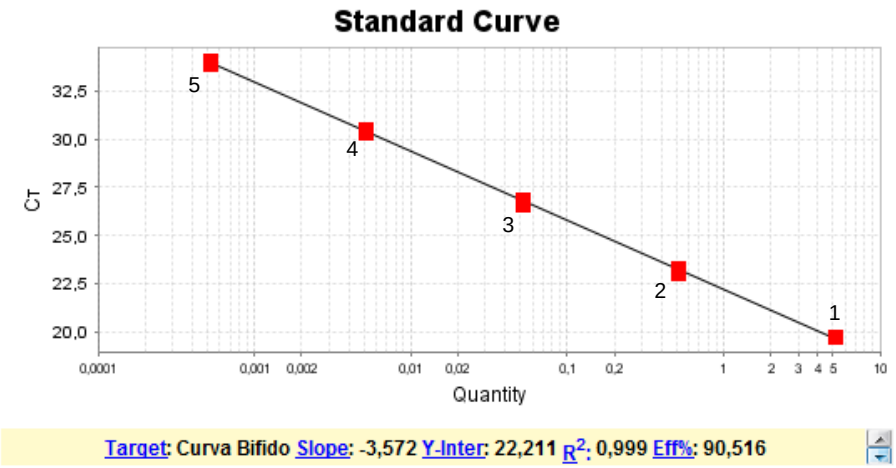


Figura 4: padronização da curva padrão com iniciador específico para *Bifidobacterium* spp.. 1. Diluição 10^0 (concentração de DNA: 5,3ng/μL, nº de cópias de DNA: $4,99.10^7$). 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}.

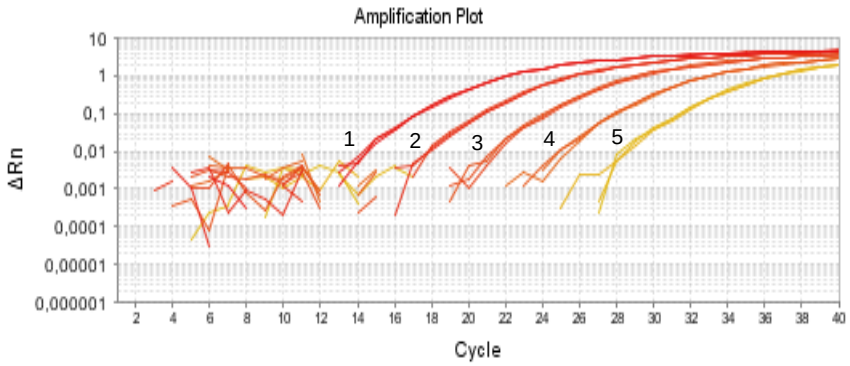


Figura 5: perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *Bifidobacterium* spp.. 1. Diluição 10^0. 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}. Experimentos realizados em triplicata.

A reação de quantificação de bactérias totais também foi padronizada empregando sistema TaqMan® (figuras 6 e 7) e com as concentrações de 200nM para os iniciadores *foward* e *reverse* e a concentração de 250nM para a sonda com *reporter* FAM e *quencher* NFQ-MGB. Nessas condições, a reação apresentou eficiência de 104,006%. Foram utilizadas 5 diluições decimais seriadas de DNA genômico de *E. coli* ATCC 25922 na construção da curva padrão e o ponto inicial teve concentração de 10,1ng/µL. De acordo com a literatura, para esse micro-organismo, é conhecido o número de cópias do gene 16S *rRNA* e por esta razão, ele foi escolhido como padrão para a quantificação total de bactérias.

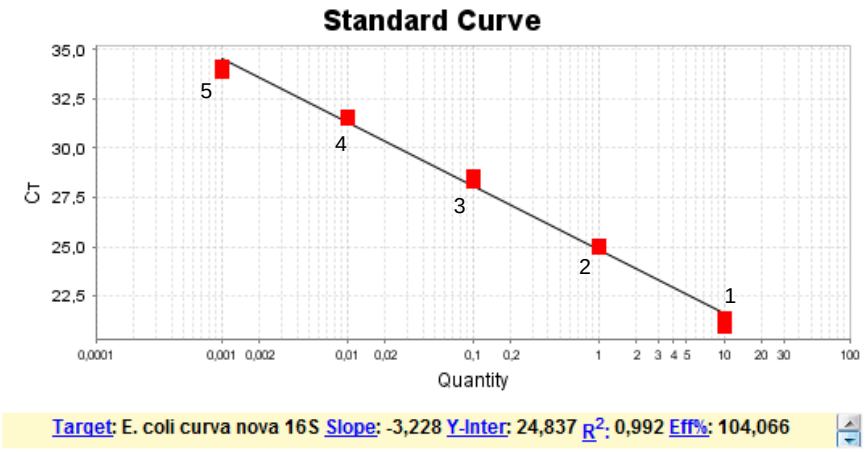


Figura 6: padronização da curva padrão com iniciador para bactérias totais, com DNA de *E.coli* ATCC 25922. 1. Diluição 10^0 (concentração de DNA: 10,1ng/µL, nº de cópias de DNA: $3{,}93.10^7$). 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}.

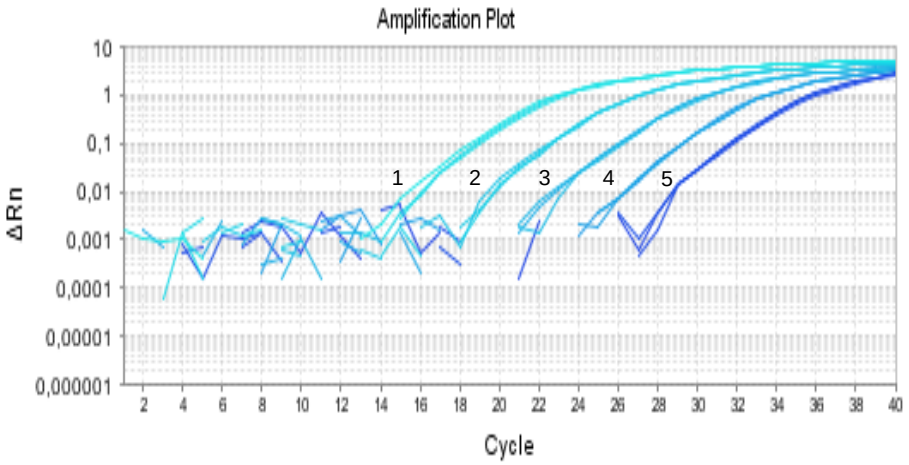


Figura 7: perfil de amplificação da curva padrão com iniciador para bactérias totais, com DNA de *E.coli* ATCC 25922. 1. Diluição 10^0. 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}. Experimentos realizados em triplicata.

A padronização da reação de quantificação de bactérias do gênero *Lactococcus* empregou sistema SYBR Green® I (figuras 8 e 9) e com as concentrações de 300nM para o iniciador *foward* e 900nM para o iniciador *reverse*, apresentou eficiência de 104,469%. A curva de *melting* comprovou a especificidade da reação (figura 10). Foram utilizadas 5 diluições decimais seriadas de DNA genômico de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* na construção da curva padrão e o ponto inicial teve concentração de 9ng/μL.

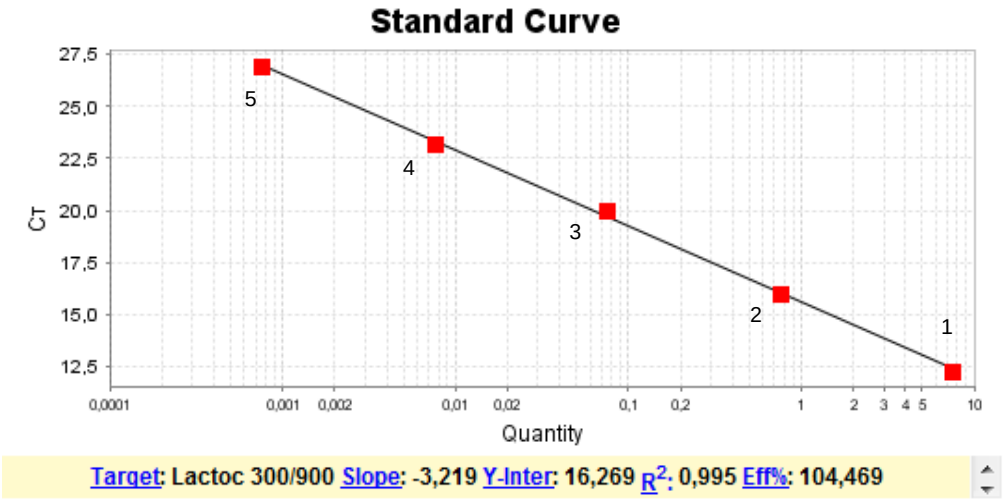


Figura 8: padronização da curva padrão com iniciador específico para *Lactococcus* spp.. 1. Diluição 10^0 (concentração de DNA: 9ng/μL, nº de cópias de DNA: $6{,}94.10^7$). 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}.

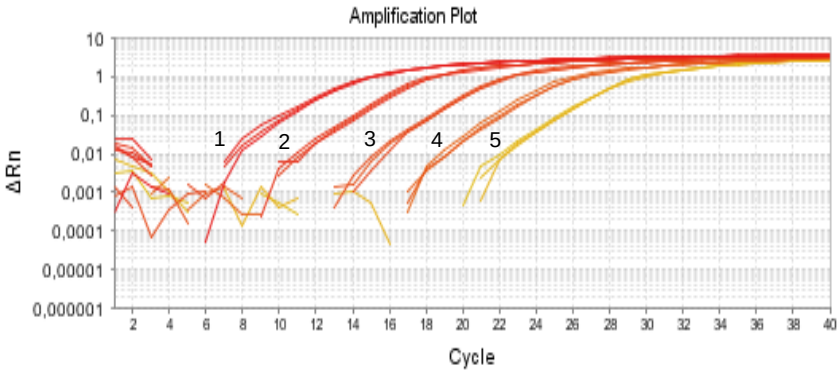


Figura 9: perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *Lactococcus* spp.. 1. Diluição 10^0. 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}. Experimentos realizados em triplicata.

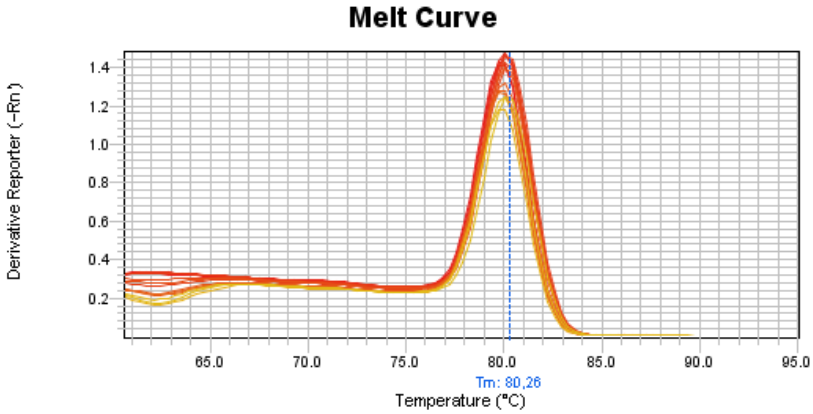


Figura 10: curva de *melting* para padronização com iniciador específico para *Lactococcus* spp..

A padronização da reação de quantificação de bactérias do gênero *Lactobacillus* utilizou sistema SYBR Green® I (figuras 11 e 12) e com as concentrações de 300nM para os iniciadores *foward* e *reverse*, apresentou eficiência de 93,237%. A curva de *melting* comprovou a especificidade da reação (figura 13). Foram utilizadas 5 diluições decimais seriadas de DNA genômico de *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 na construção da curva padrão e o ponto inicial teve concentração de 10,1ng/μL.

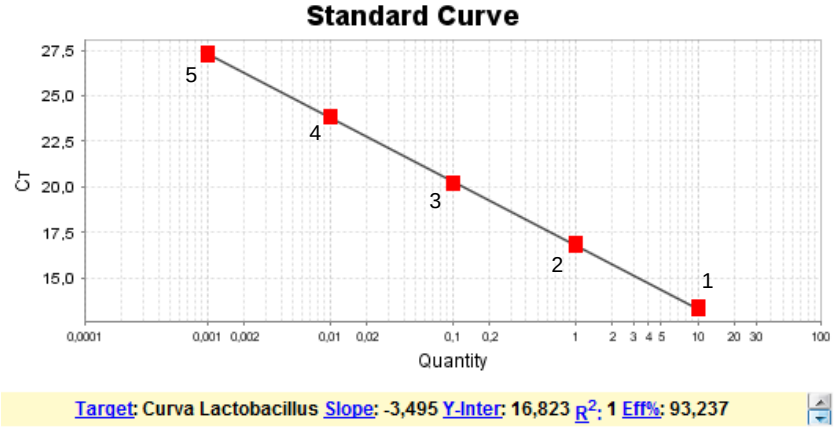


Figura 11: padronização da curva padrão com iniciador específico para *Lactobacillus* spp.. 1. Diluição 10^0 (concentração de DNA: 10,1ng/µL, nº de cópias de DNA: $9,25.10^7$). 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}.

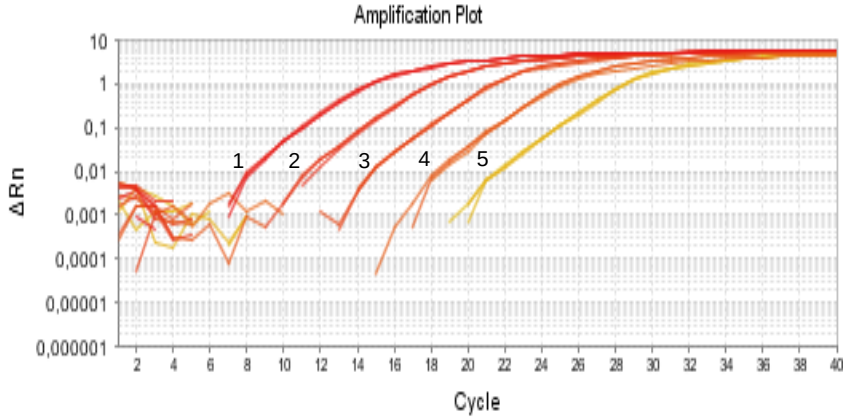


Figura 12: perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *Lactobacillus* spp..
1. Diluição 10^0. 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}.
Experimentos realizados em triplicata.

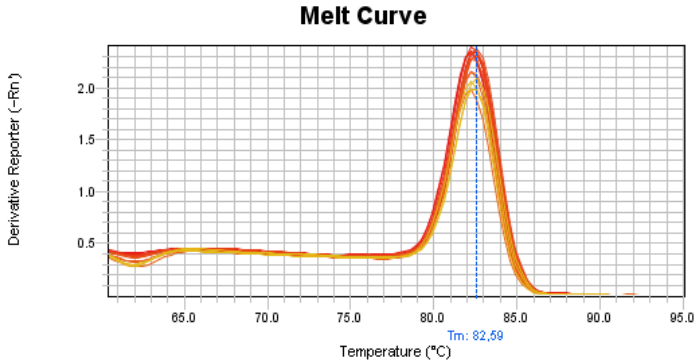


Figura 13: curva de *melting* para padronização com iniciador específico para *Lactobacillus* spp..

A padronização da reação de quantificação de *E. coli* também foi realizada com sistema SYBR Green® I (figuras 14 e 15) e com as concentrações de 50nM para o iniciador *foward* e 900nM para o iniciador *reverse*. Com essas condições, apresentou eficiência de 102,014%. A curva de *melting* comprovou a especificidade da reação (figura 16). Foram utilizadas 5 diluições decimais seriadas de DNA genômico de *E. coli* ATCC25922 na construção da curva padrão e o ponto inicial teve concentração de 11,5ng/µL.

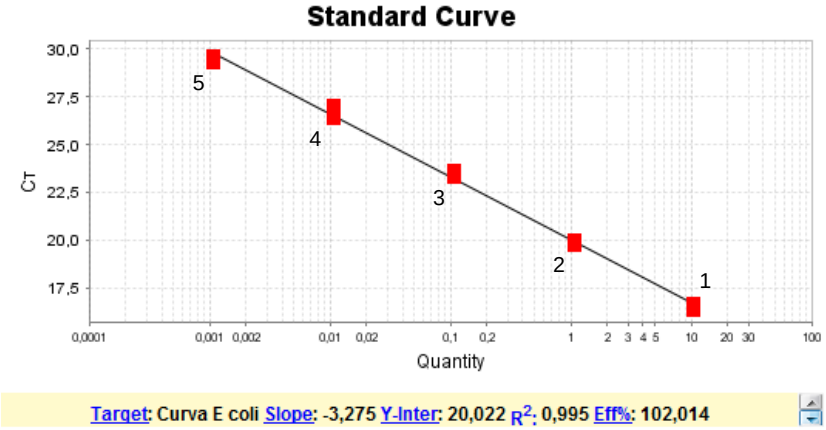


Figura 14: padronização da curva padrão com iniciador específico para *E. coli.* Diluição 10^0 (concentração de DNA: 11,5ng/µL, nº de cópias de DNA: $4{,}48.10^7$). 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}.

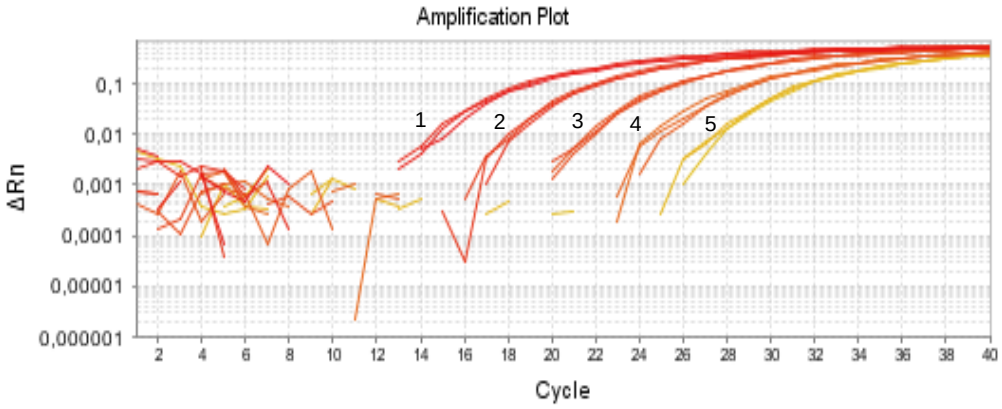


Figura 15: perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *E. coli.* Diluição 10^0. 2. Diluição 10^{-1}. 3. Diluição 10^{-2}. 4. Diluição 10^{-3}. 5. Diluição 10^{-4}. Experimentos realizados em triplicata.

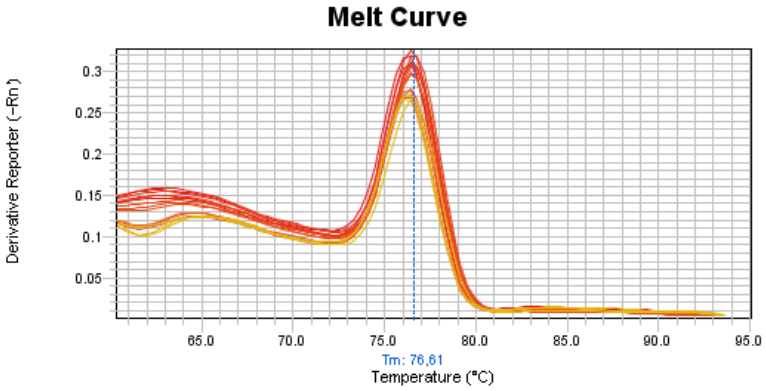


Figura 16: curva de *melting* para padronização com iniciador específico para *E. coli.*

4.2. Quantificação bacteriana nas amostras fecais estudadas

Após a determinação das concentrações ideais de iniciadores e sondas, as amostras também foram testadas e o perfil de amplificação observado determinou a necessidade ou não de diluição das mesmas, ou para adequação do Ct das amostras dentro da curva de calibração para posterior cálculo de quantificação, ou para diminuição da presença de interferentes da amplificação. Todas as amostras foram quantificadas em triplicata e o número de cópias em 1g de amostra de fezes de bactérias totais e específicas é observado na Tabela 4.

Foram incluídas neste estudo amostras de fezes de 10 crianças, nascidas de parto vaginal. As amostras analisadas representam os tempos de 24 horas, 7 dias, 30 dias, 3 meses, 6 meses e 1 ano de vida. As amostras de fezes de 24 horas foram coletadas no Alojamento Conjunto do Hospital Universitário da USP, e a partir do 7º dia de vida, as amostras foram entregues pelos responsáveis nas consultas no CSEB, previamente agendadas. Desta forma, devido a não adesão integral dos responsáveis ao projeto, ou ao não comparecimento nas consultas agendadas, algumas amostras de fezes não foram entregues. Apenas 4 das 10 crianças (crianças 1, 2, 12 e 14) possuem todas as amostras previstas, 5 crianças não possuem uma das amostras (crianças 3, 7, 8, 15 e 17) e uma (criança 13) não possui duas das amostras previstas (Tabela 4).

Tabela 4 – Quantificação do número de cópias de DNA/g de fezes

		Alvo	Bactérias totais	*Bifidobacterium* spp.	*E. coli*	*Lactobacillus* spp.	*Lactococcus* spp.
		Sistema	TaqMan®	TaqMan®	SYBR® Green I	SYBR® Green I	SYBR® Green I
		Condições	200/200/250nM vol 20µL	300/300/250nM vol 20µL	50/900nM vol 20µL	300/300nM Vol 20µL	300/900 vol 20µL
Criança	**Amostra**	**Tempo**	**nº de cópias de DNA/g de fezes**				
1	1	24h	2,30E+08	0,00E+00	1,72E+09	0,00E+00	0,00E+00
	1.2	7d	2,19E+11	2,59E+11	5,83E+10	0,00E+00	0,00E+00
	1.3	30d	3,87E+12	6,95E+11	1,02E+10	0,00E+00	0,00E+00
	1.5	3m	3,84E+11	1,07E+11	2,63E+09	1,03E+09	7,83E+06
	1.8	6m	7,94E+08	2,72E+09	9,36E+08	1,31E+09	1,06E+08
	1.13	1 ano	1,13E+12	1,41E+11	4,02E+07	2,19E+10	0,00E+00
2	2B	24h	6,46E+10	4,55E+10	9,30E+08	3,20E+05	2,03E+05
	2.2	7d	1,19E+11	9,48E+12	4,05E+08	5,18E+07	0,00E+00
	2.3	30d	8,50E+11	4,49E+11	1,85E+09	1,79E+05	0,00E+00
	2.6	3m	6,19E+11	6,49E+12	8,76E+10	1,49E+10	9,54E+07
	2.9	6m	2,89E+11	1,14E+12	1,50E+09	2,94E+09	5,38E+07
	2.15	1 ano	7,40E+12	7,26E+09	1,27E+10	7,57E+09	5,83E+08
3	3.1	24h	3,45E+12	1,53E+11	3,34E+11	1,99E+07	0,00E+00
	3.3	30d	1,28E+12	1,18E+12	2,08E+10	3,09E+06	0,00E+00
	3.6	3m	7,13E+11	1,15E+13	1,31E+10	2,70E+09	8,22E+07
	3.8	6m	9,61E+10	3,97E+11	7,70E+10	3,60E+09	4,39E+07
	3.14	1 ano	1,21E+12	4,29E+11	9,31E+10	8,63E+09	8,30E+07
7	7.1	24h	2,81E+11	1,86E+09	0,00E+00	1,09E+11	0,00E+00
	7.2	7d	2,35E+11	6,62E+11	4,59E+10	5,38E+06	0,00E+00
	7.5	3m	1,24E+12	2,02E+11	9,72E+10	4,31E+08	4,65E+08
	7.7	6m	1,20E+11	1,83E+10	1,17E+09	2,22E+08	3,81E+07
	7.12	1 ano	3,84E+11	5,14E+10	3,01E+10	3,96E+09	6,42E+08

Continua

Criança	**Amostra**	**Tempo**	Bactérias totais	*Bifidobacterium* spp.	*E. coli*	*Lactobacillus* spp.	*Lactococcus* spp.
8	8.1	24h	2,95E+11	4,79E+10	5,67E+09	3,08E+04	2,35E+06
	8.2	7d	5,05E+11	0,00E+00	4,21E+10	0,00E+00	0,00E+00
	8.5	3m	4,41E+10	1,32E+11	1,43E+09	4,04E+08	2,77E+07
	8.7	6m	3,01E+11	7,14E+10	8,00E+09	3,06E+09	4,55E+07
	8.12	1 ano	1,60E+12	1,48E+11	1,69E+08	5,97E+08	6,82E+08
12	12.1	24h	1,02E+11	5,24E+11	7,00E+11	4,43E+09	1,87E+07
	12.2	7d	2,81E+11	6,70E+11	2,34E+09	2,81E+09	2,06E+07
	12.3	30d	8,38E+11	1,21E+12	1,22E+11	5,55E+09	2,16E+07
	12.4	3m	5,72E+09	1,00E+10	3,32E+09	6,18E+10	1,65E+07
	12.9	6m	4,42E+11	1,89E+11	2,45E+09	2,60E+09	5,61E+07
	12.13	1 ano	8,00E+10	3,80E+11	1,93E+11	3,14E+06	1,52E+07
13	13.2	7d	7,82E+11	2,48E+11	2,03E+08	1,35E+08	4,92E+07
	13.3	30d	1,06E+11	6,87E+10	1,65E+07	5,43E+07	6,16E+07
	13.8	6m	2,33E+10	4,79E+10	8,91E+09	4,86E+04	5,61E+07
	13.15	1 ano	1,54E+11	2,68E+08	7,39E+07	1,15E+08	2,48E+07
14	14.1	24h	3,60E+10	6,10E+08	1,36E+10	1,45E+07	1,48E+07
	14.2	7d	1,52E+11	2,55E+10	7,23E+10	2,58E+07	1,74E+07
	14.3	30d	5,78E+11	3,98E+10	1,26E+09	1,54E+08	8,18E+07
	14.5	3m	3,80E+11	1,92E+10	4,96E+10	4,77E+08	1,79E+07
	14.8	6m	5,15E+10	5,30E+10	7,57E+08	4,63E+07	6,08E+07
	14.14	1 ano	7,24E+11	1,06E+12	2,41E+09	2,63E+08	1,36E+07
15	15.1	24h	9,65E+09	0,00E+00	1,11E+10	1,01E+09	3,44E+07
	15.3	30d	3,43E+10	6,69E+11	1,66E+11	2,98E+09	5,76E+07
	15.6	3m	5,60E+11	1,58E+12	3,10E+09	4,16E+07	1,67E+08
	15.9	6m	6,66E+09	5,04E+09	4,05E+09	1,91E+03	1,59E+07
	15.16	1 ano	1,30E+11	2,70E+11	1,68E+10	8,90E+05	8,05E+06
17	17.1	24h	8,67E+09	2,10E+08	2,47E+07	8,00E+07	5,51E+07
	17.2	7d	1,17E+12	5,90E+06	1,09E+07	1,90E+08	1,21E+08
	17.3	30d	3,80E+12	1,95E+07	2,15E+08	3,67E+08	1,94E+08
	17.8	6m	3,78E+11	0,00E+00	1,72E+10	1,32E+11	6,33E+07
	17.13	1 ano	2,48E+11	1,38E+11	2,47E+11	1,03E+09	1,04E+08

O gênero *Bifidobacterium* spp. esteve presente em todas as crianças analisadas, porém, não em todos os tempos (Tabelas 4 e 5, gráfico 1A). Observa-se também que este gênero foi predominante neste grupo de crianças, em relação aos outros gêneros testados. Não foi possível observar um padrão de colonização deste gênero como pode ser observado nos gráficos de números 1 a 10. Contudo, de um modo geral, entre 30 dias e 3 meses de idade, a quantificação de *Bifidobacterium* spp. atingiu níveis máximos e uma menor variação dos níveis de colonização entre 6 e 12 meses. As quantificações variaram, em média, entre $8,27x10^{10}$ a $2,51x10^{12}$ nº de cópias/g de fezes.

Entre as bactérias anaeróbias pesquisadas, o gênero *Lactococcus* é o que aparece em menor quantidade, mas também presente em todas as crianças. Entre as amostras analisadas, apenas 6 crianças apresentaram colonização pelo micro-organismo já nas primeiras 24 horas (gráfico 1B). Neste gênero também, observa-se uma menor variação entre os níveis de colonização entre 6 e 12 meses. As quantificações variaram, em média, entre $1,40x10^{7}$ a $2,16x10^{8}$ nº de cópias/g de fezes.

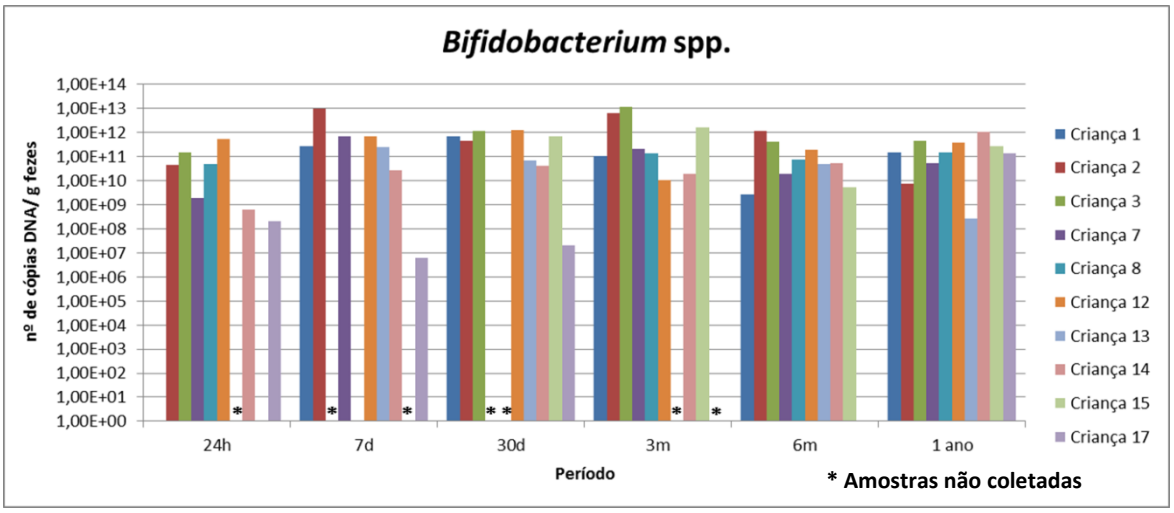
O gênero *Lactobacillus* também esteve presente em todas as crianças, porém não em todos os tempos (Tabelas 4 e 5, gráfico 1C). Os índices máximos de quantificação deste gênero foram encontrados, de modo geral, entre 3 e 6 meses de idade (gráfico 1C). As quantificações variaram, em média, entre $4,03x10^{8}$ a $1,46x10^{10}$ nº de cópias/g de fezes.

Comparando-se os perfis de ausência dos gêneros pesquisados, observa-se que a ausência destas bactérias anaeróbias na microbiota deste grupo de crianças ocorre nas primeiras semanas de vida, entre 24 horas, 7 dias e 30 dias (Tabela 5).

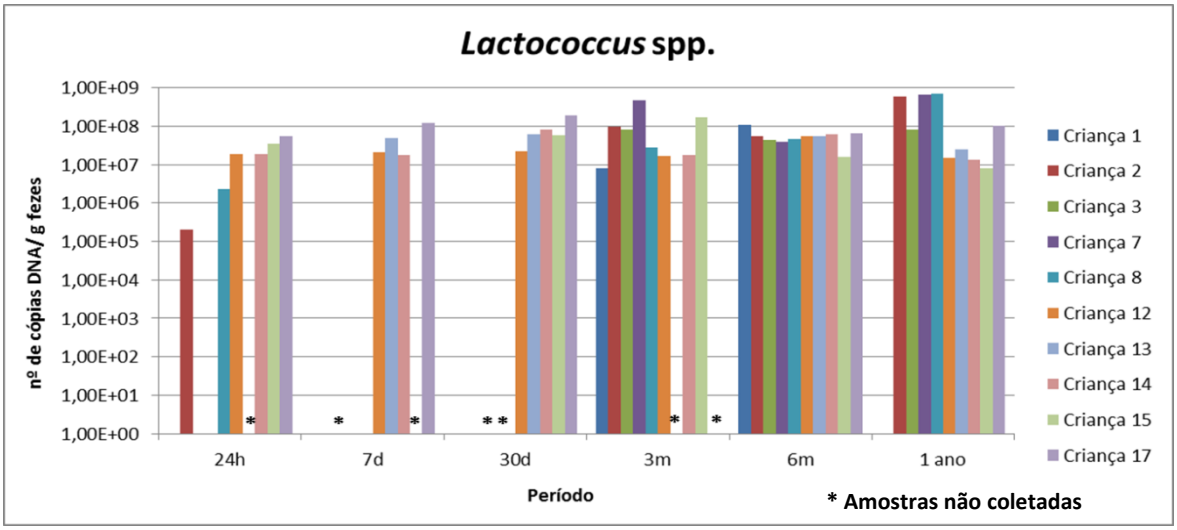
*E. co*li foi encontrada colonizando todas as crianças estudadas (gráfico 1D). A quantificação de *E. coli* nestas amostras mostrou que não há um padrão de colonização por esta bactéria nos tempos estudados, assim como também não foi observado um padrão ao longo dos meses para cada criança. Porém, nota-se que este gênero não sofreu variações significativas ao longo dos meses analisados, em relação às bactérias anaeróbias estudadas. As quantificações variaram, em média, entre $1,22x10^{10}$ a $1,19x10^{11}$ nº de cópias/g de fezes. Apenas uma criança não apresentou esta bactéria nas primeiras 24 horas de vida, e cinco das dez crianças estudadas apresentaram quantidades de *E. coli* superior à *Bifidobacterium* spp. nas primeiras 24 horas de vida (Tabelas 4 e 5). Em algumas crianças, os índices de

quantificação de *E. coli* e *Bifidobacterium* spp. foram semelhantes ao longo dos tempos estudados (Tabela 4).

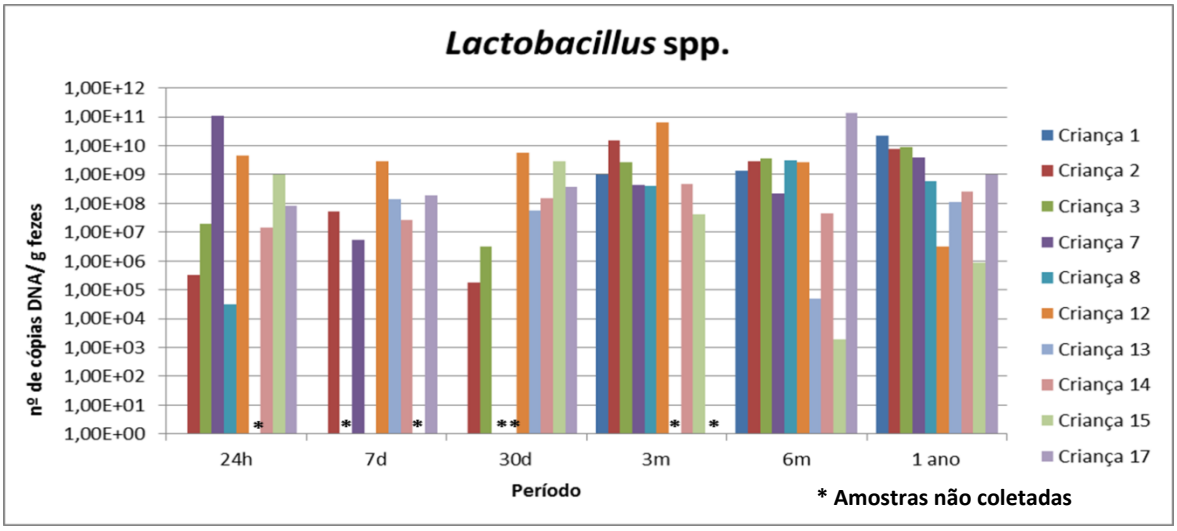
A



B



C



D

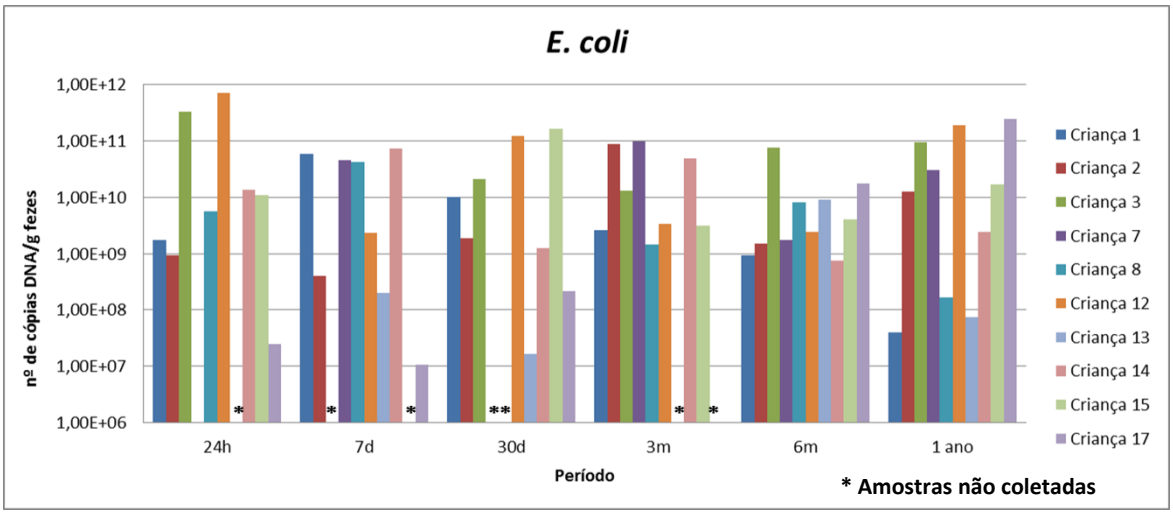


Gráfico 1: quantificação dos gêneros bacterianos ao longo dos meses estudados. A) Quantificação de *Bifidobacterium* spp. B) Quantificação de *Lactococcus* spp. C) Quantificação de *Lactobacillus* spp. D) Quantificação de *Escherichia coli*.

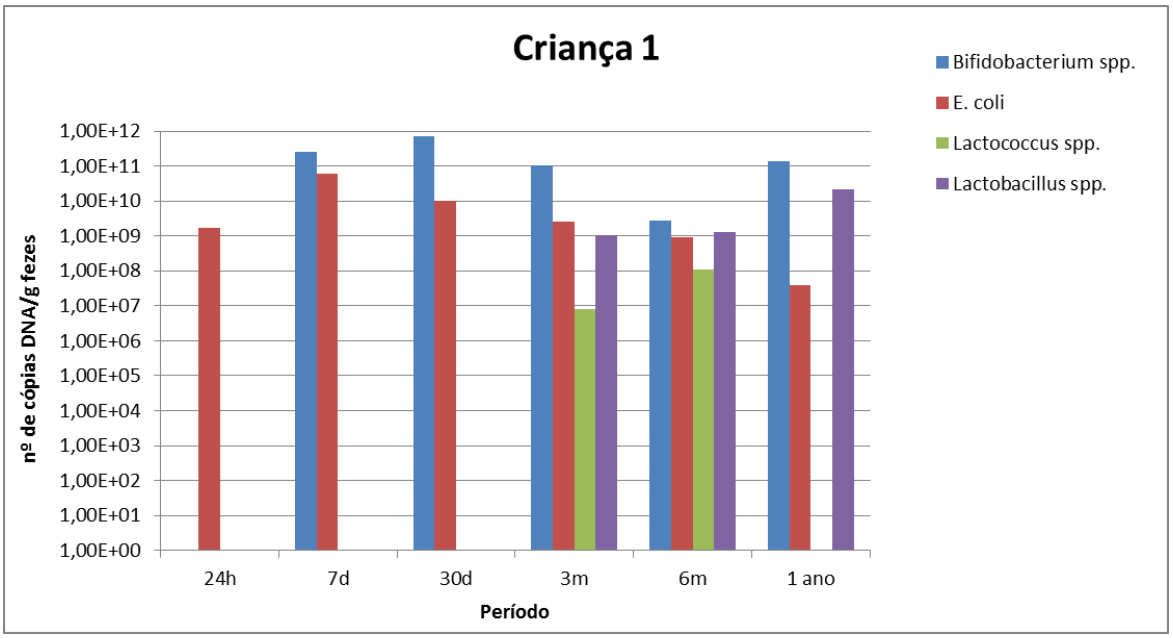


Gráfico 2: Criança 1 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.

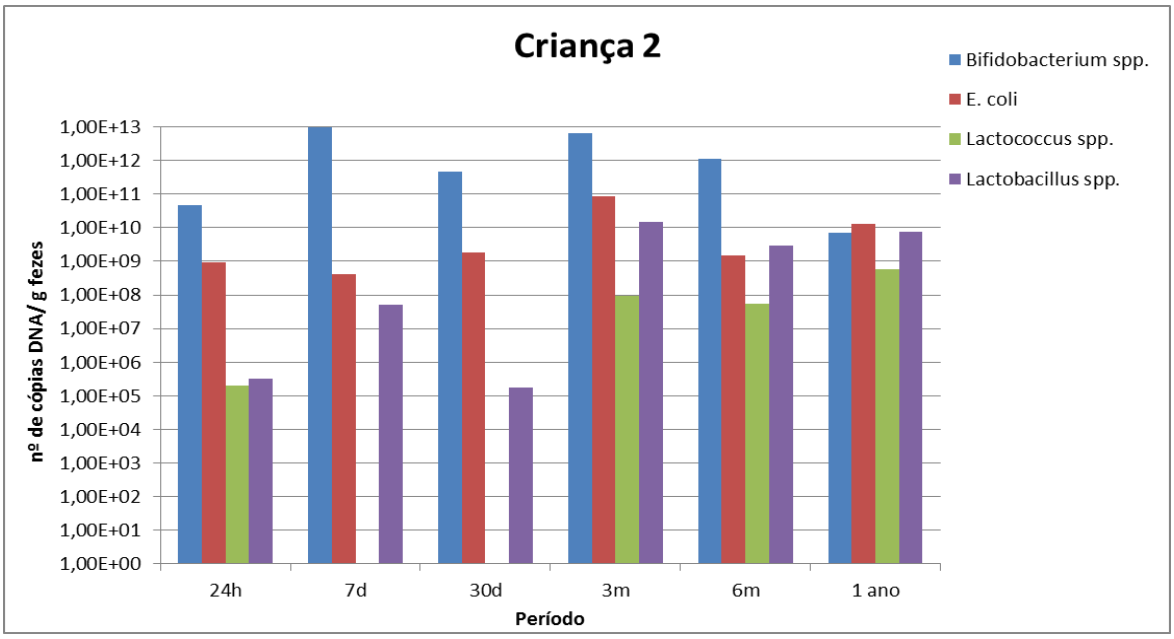


Gráfico 3: Criança 2 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.

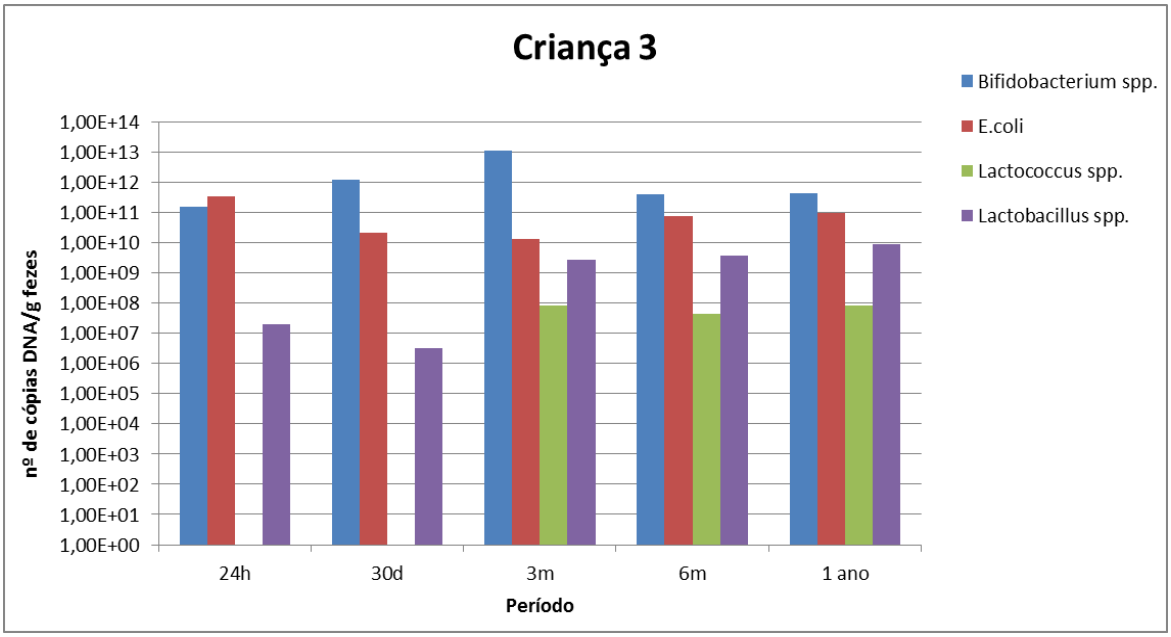


Gráfico 4: Criança 3 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.

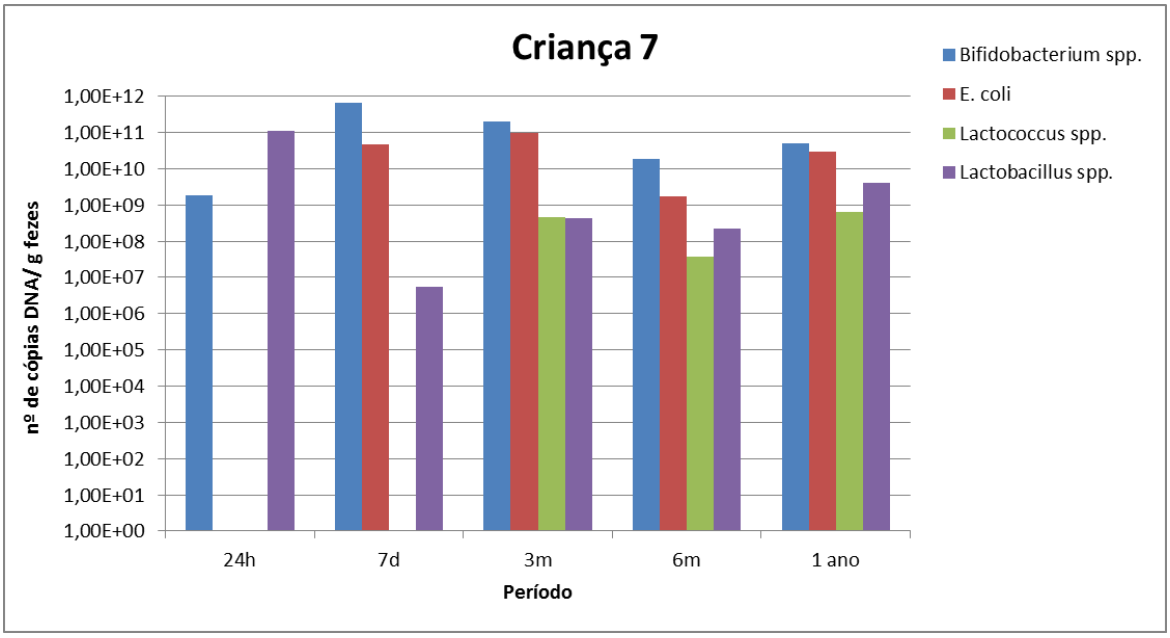


Gráfico 5: Criança 7 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.

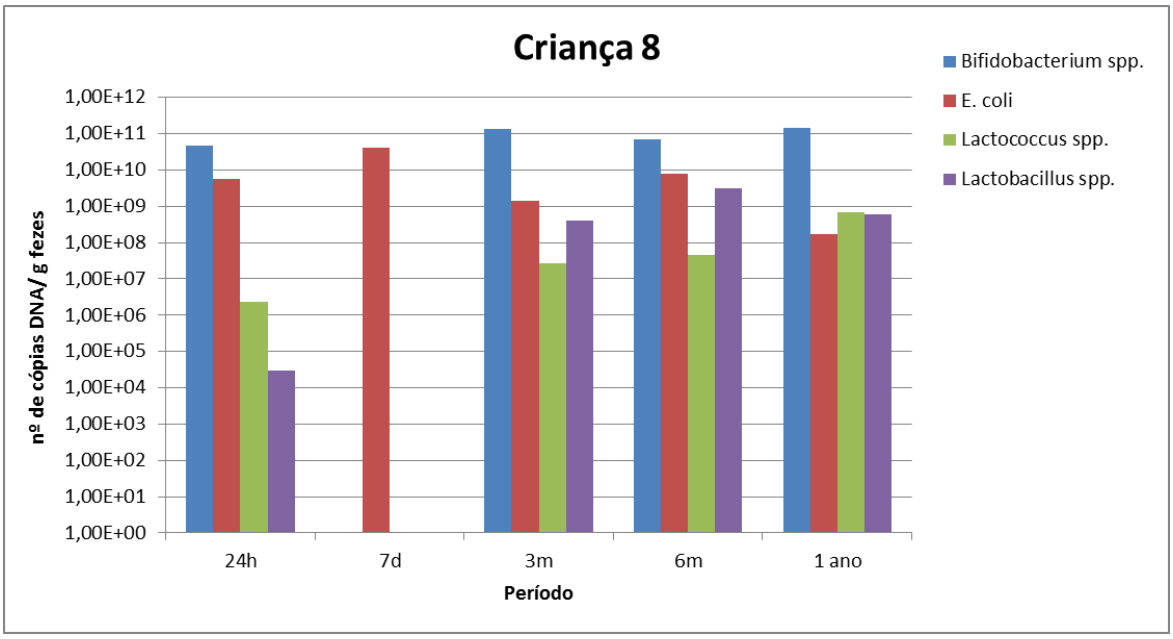


Gráfico 6: Criança 8 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.

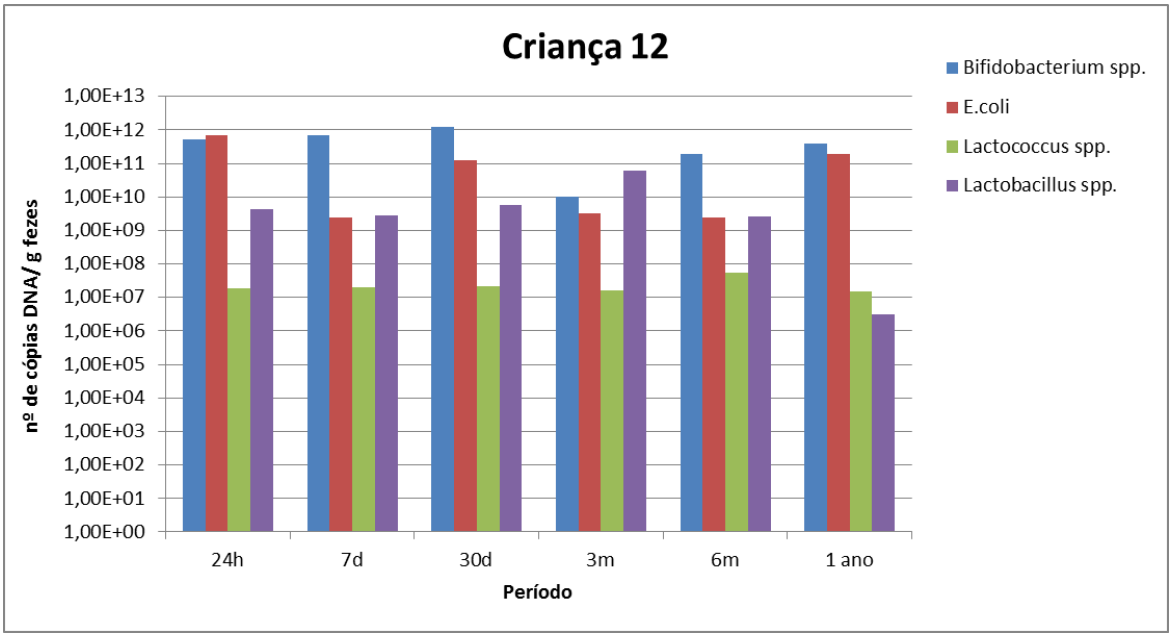


Gráfico 7: Criança 12 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.

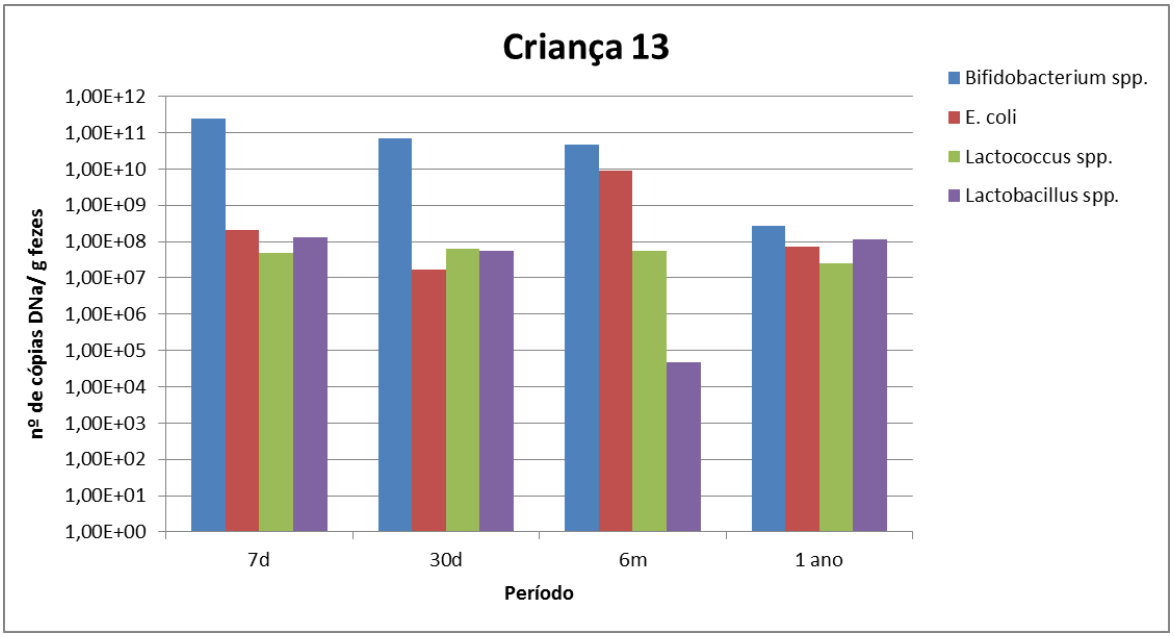


Gráfico 8: Criança 13 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.

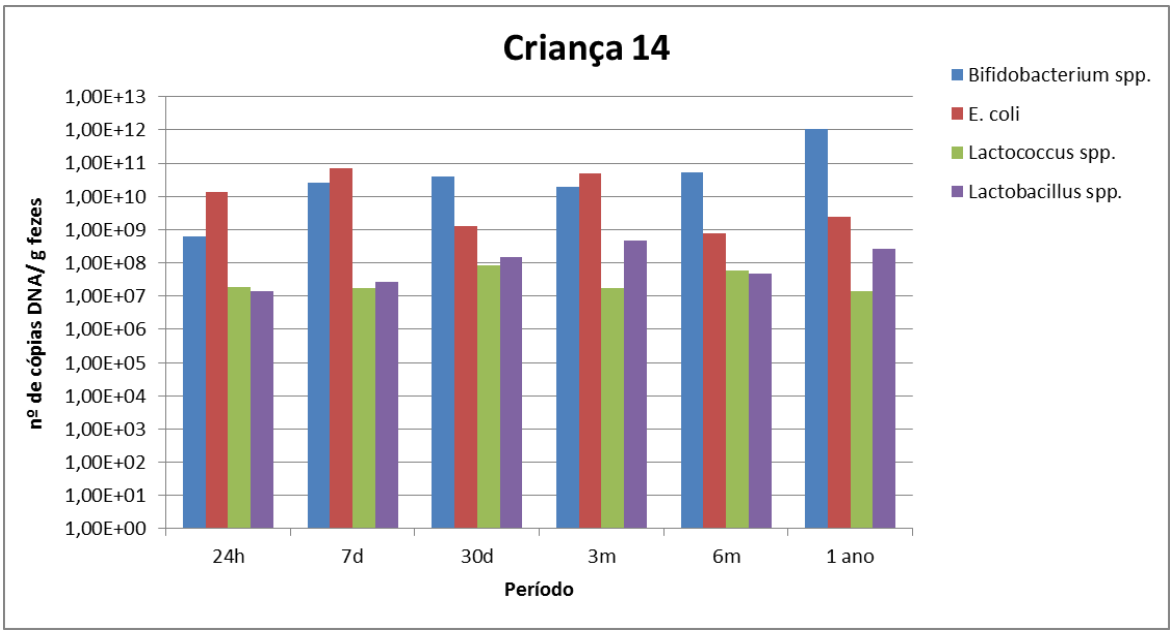


Gráfico 9: Criança 14 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.

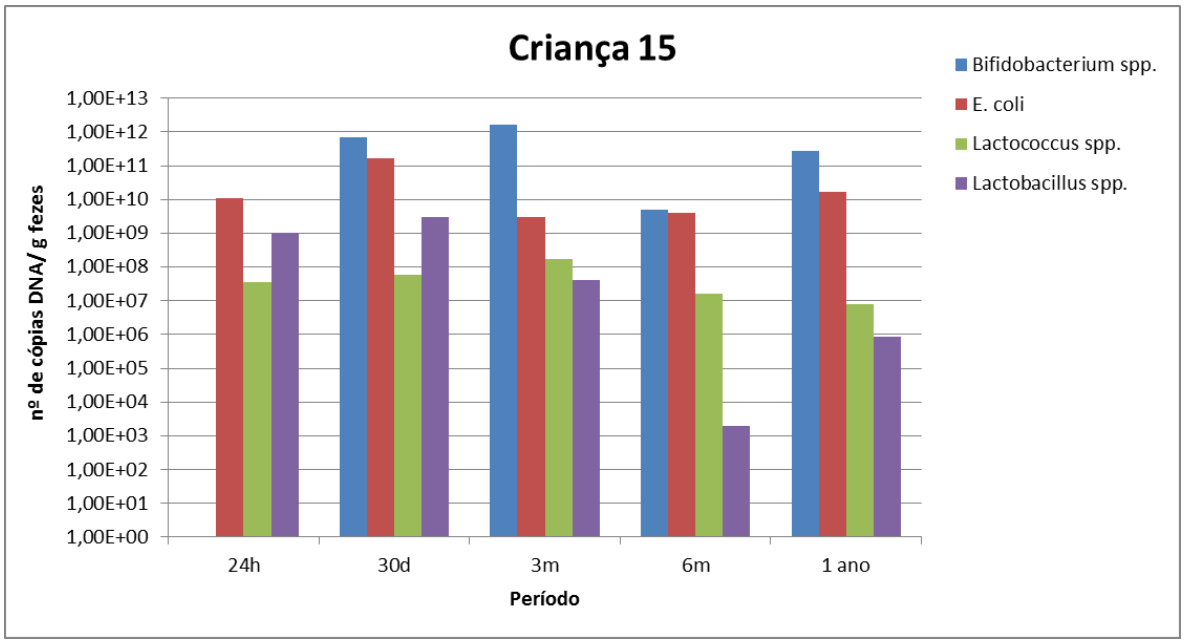


Gráfico 10: Criança 15 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E.coli* por período.

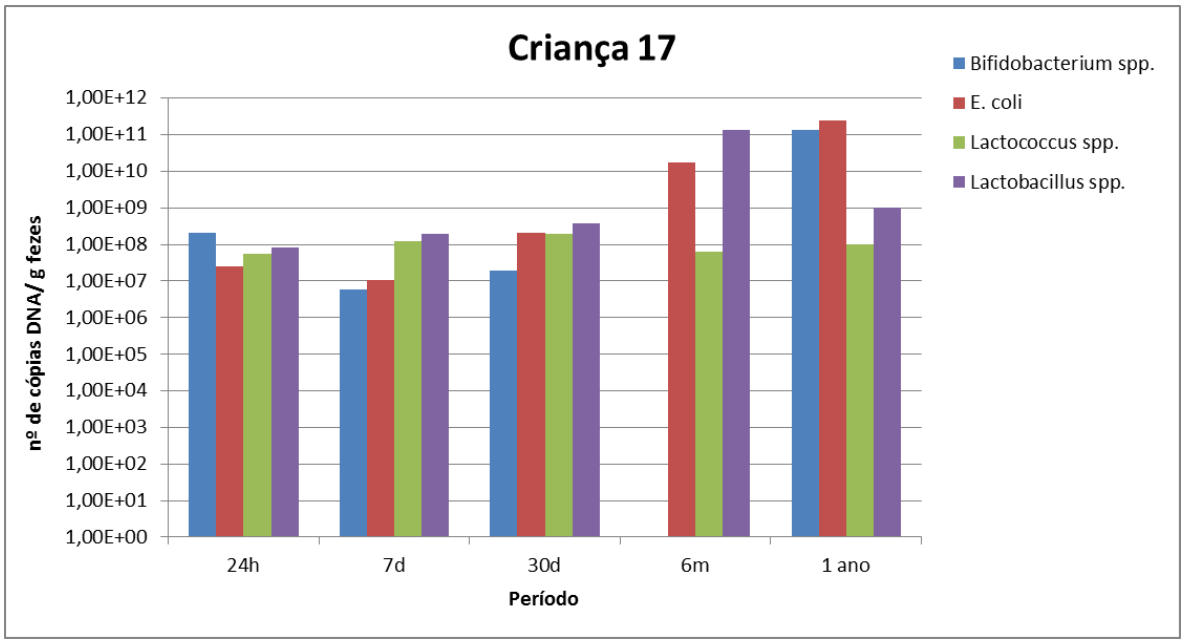


Gráfico 11: Criança 17 – Quantificação de bactérias anaeróbias e *E. coli* por período.

Entre as 10 crianças incluídas neste estudo, 6 foram alimentadas com aleitamento misto e introdução de alimentos pastosos e iogurtes já a partir do terceiro mês de idade (crianças 1, 2, 7, 8, 12 e 15). As crianças 2 e 8, por exemplo, aos 3 meses, foram alimentadas com iogurtes, o que pode justificar um aumento nesse período de bifidobactérias e lactobacilos (gráficos 3 e 6).

A análise do perfil da composição da microbiota nos tempos estudados mostra que 6 crianças (1, 2, 3, 7, 8 e 14) não sofreram modificações significativas entre os 3 e 12 meses de idade (gráficos 2-6 e 9). Não foi possível relacionar este fato aos históricos individuais de cada criança. Quatro crianças (12, 13, 15 e 17) mostraram alterações nas quantificações dos gêneros em estudo, ao longo dos meses.

A criança de número 12 mostra, aos 3 meses, uma alteração significativa da quantidade de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. aos 12 meses de idade. Porém, em seu histórico, a única alteração neste período, foi a administração de antibiótico oral aos 9 meses de idade para tratar uma sinusite (gráfico 7).

A criança de número 13 mostrou uma alteração no perfil da microbiota aos 6 meses de idade, possivelmente como resultados da transição da dieta, quando uma alimentação sólida é introduzida, além de leite em pó (gráfico 8).

A criança de número 15 mostra uma alteração ao longo dos meses. Esta criança apresentou aos 5 meses de idade um quadro de epilepsia grave, e até os 12 meses de idade, havia sido hospitalizada nove vezes (gráfico 10).

A criança de número 17 mostra uma alteração no perfil da microbiota aos 6 e aos 12 meses de idade. Seu histórico mostra um quadro familiar de alergia (gráfico 11).

A totalidade de bactérias também foi quantificada para todas as amostras (Tabela 4), utilizando DNA genômico de *E. coli* ATCC25922 na construção da curva padrão. De acordo com a literatura, para esse micro-organismo, é conhecido o número de cópias do gene 16S *rRNA* e por esta razão, ele foi escolhido como padrão para a quantificação total de bactérias (Tabela 4).

4.3. Padronização da reação de presença/ausência de *Eubacterium* spp. por qPCR

A prova de presença/ausência para detecção de bactérias do gênero *Eubacterium* por qPCR foi padronizada utilizando o sistema SYBR-Green® I (figura 17). As concentrações de iniciadores, tanto *foward* quanto *reverse* foram definidas em 300nM. O volume total final de reação foi determinado em 20μL, sendo 2μL de DNA extraído de fezes conforme descrição anterior e o volume restante composto por mix e iniciadores.

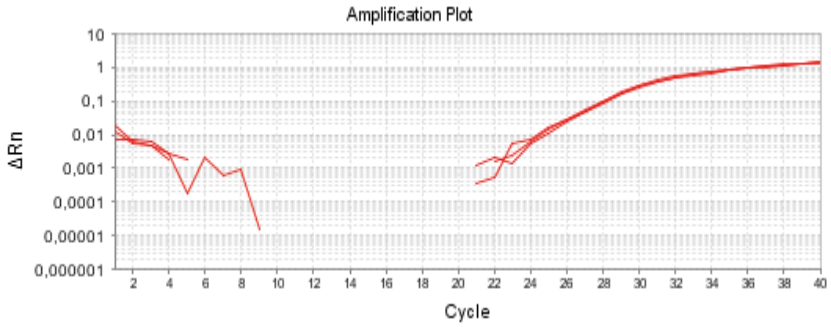


Figura 17: padronização da reação de presença/ausência com iniciador específico para *Eubacterium* spp..

A curva de *melting* foi utilizada para mostrar a especificidade da dissociação dos iniciadores entre o controle positivo (clone de *Eubacterium limosum*, na concentração de 5ng/μL) e amostras, que foram avaliadas em triplicata (figura 18).

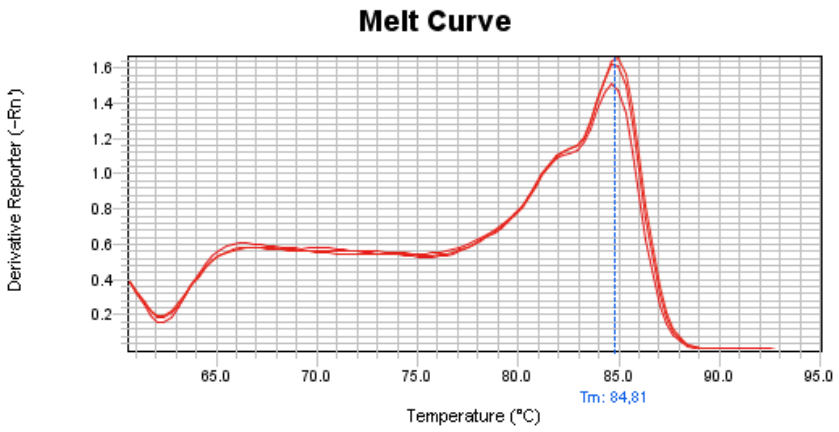


Figura 18: curva de *melting* da padronização da reação de presença/ausência para *Eubacterium* spp..

4.4. Resultados da reação de presença/ausência de *Eubacterium* spp. por qPCR

O teste de presença/ausência para *Eubacterium* spp. registrou a presença deste gênero bacteriano anaeróbio somente em duas crianças (7 e 13), sendo na criança 7 aos 3 meses e na criança 13, nos períodos de 7 dias e 6 meses. Nas demais amostras analisadas, este gênero não foi detectado (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação da ausência de *Eubacterium* spp. e demais micro-organismos por qPCR

		Alvo	*Eubacterium* spp.	*Bifidobacterium* spp.	*E. coli*	*Lactobacillus* spp.	*Lactococcus* spp.
		Sistema	SYBR® Green I	TaqMan®	SYBR® Green I	SYBR® Green I	SYBR® Green I
		Condições	300/300nM vol 20µL	300/300/250nM vol 20µL	50/900nM vol 20µL	300/300nM Vol 20µL	300/900nM vol 20µL
Criança	**Amostra**	**Tempo**	**Ausência do micro-organismo**				
1	1	24h	◆	◆		◆	◆
	1.2	7d	◆			◆	◆
	1.3	30d	◆			◆	◆
	1.5	3m	◆				
	1.8	6m	◆				
	1.13	1 ano	◆				◆
2	2B	24h	◆				
	2.2	7d	◆				◆
	2.3	30d	◆				◆
	2.6	3m	◆				
	2.9	6m	◆				
	2.15	1 ano	◆				
3	3.1	24h	◆				◆
	3.3	30d	◆				◆
	3.6	3m	◆				
	3.8	6m	◆				
	3.14	1 ano	◆				
7	7.1	24h	◆		◆		◆
	7.2	7d	◆				◆
	7.5	3m					
	7.7	6m	◆				
	7.12	1 ano	◆				

Continua

Criança	Amostra	Tempo	*Eubacterium* spp.	*Bifidobacterium* spp.	*E. coli*	*Lactobacillus* spp.	*Lactococcus* spp.
8	8.1	24h	◆				
	8.2	7d	◆	◆		◆	◆
	8.5	3m	◆				
	8.7	6m	◆				
	8.12	1 ano	◆				
12	12.1	24h	◆				
	12.2	7d	◆				
	12.3	30d	◆				
	12.4	3m	◆				
	12.9	6m	◆				
	12.13	1 ano	◆				
13	13.2	7d					
	13.3	30d	◆				
	13.8	6m					
	13.15	1 ano	◆				
14	14.1	24h	◆				
	14.2	7d	◆				
	14.3	30d	◆				
	14.5	3m	◆				
	14.8	6m	◆				
	14.14	1 ano	◆				
15	15.1	24h	◆	◆			
	15.3	30d	◆				
	15.6	3m	◆				
	15.9	6m	◆				
	15.16	1 ano	◆				
17	17.1	24h	◆				
	17.2	7d	◆				
	17.3	30d	◆				
	17.8	6m	◆	◆			
	17.13	1 ano	◆				

Lengenda: ◆ - ausência do micro-organismo

5. DISCUSSÃO

A microbiota do TGI desempenha um papel importante na saúde e doença do hospedeiro. O desequilíbrio da comunidade microbiana está intimamente ligado a uma série de graves desordens do funcionamento do TGI, como a doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável, câncer estomacal, linfomas, obesidade, enterocolite necrotizante, diabetes tipo 2 (LARSEN et al, 2010; TURRONI et al, 2012).

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. Portanto, o conhecimento da microbiota permite a utilização de diferentes estratégias com o intuito de manipular as populações bacterianas e promover a saúde. Entretanto, a complexa microbiota do adulto é difícil de manipular. Sabe-se que as primeiras bactérias que colonizam o TGI parecem ter importante papel na regulação da colonização subsequente (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999). Essas bactérias iniciais poderiam modular a expressão gênica 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 diferentes gêneros bacterianos, trazendo consequências para toda a vida (FURRIE, 2006; GUARNER; MALAGELADA, 2003; TURRONI et al, 2012).

O desenvolvimento da microbiota intestinal acontece durante a infância e qualquer desequilíbrio nesta composição contribui, potencialmente, para a ocorrência de uma gama de doenças (VAEL; DESAGER, 2009).

O intestino, estéril ao nascimento, é colonizado inicialmente por bactérias anaeróbias facultativas, entre elas as enterobactérias, *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp., devido a elevada concentração de oxigênio presente. Após a primeira semana de vida, a multiplicação das bactérias facultativas leva ao consumo do oxigênio, tornando o ambiente favorável a colonização por bactérias anaeróbias, como *Bifidobacterium* spp., por exemplo (VAEL; DESAGER, 2009).

A otimização da microbiota intestinal pelo uso de pré e probióticos durante o período de colonização intestinal tem sido sugerida. Entretanto, ressalta-se a importância de se conhecer mais profundamente como ocorre a instalação da

microbiota e quais as consequências a longo prazo de possíveis intervenções neste processo (EDWARDS; PARRET, 2002).

E. coli foi encontrada colonizando todas as crianças, e nas primeiras 24 horas, em maior quantidade que o gênero *Bifidobacterium* spp. em 5 crianças. Este dado foi observado, ao comparar, nos períodos de 24 horas e 7 dias, a presença de *E. coli* com os gêneros anaeróbios nas crianças 1, 3, 12, 14 e 15. Em 24 horas, a quantidade de *E. coli* é maior que a dos gêneros anaeróbios e, após 1 semana, percebe-se uma diminuição da quantidade desta bactéria facultativa e aumento da quantidade de micro-organismos anaeróbios corroborando com dados já descritos na literatura (PENDERS et al, 2006).

A origem da colonização por *E. coli* pode ser a microbiota materna ou contaminação ambiental, inclusive por contato da equipe médica no momento do parto ou durante o período de hospitalização. Porém, o fator ambiental também influencia a presença em grande quantidade desta bactéria nas amostras analisadas, uma vez que são crianças que vivem em condições sócio-econômicas desfavoráveis. Esta bactéria coloniza o intestino grosso por períodos prolongados, uma vez que expressa fímbria P e tem a capacidade de aderir às células colônicas. (NOWROUZIAN et al, 2003). Herías et al. (1995) mostra que na presença de bactérias como *Lactobacillus acidophilus* ou *Pepstreptococcus* spp., *E. coli* expressa a fímbria, sugerindo que estes micro-organismos também desempenham papel importante na persistência da *E. coli* na microbiota intestinal.

Em trabalhos anteriores conduzidos em nosso laboratório com essas amostras de fezes, notamos a alta frequência e riqueza de *Escherichia* spp. ao longo dos tempos estudados (BRANDT et al 2012; OLIVEIRA, 2011; TADDEI et al, dados não publicados). Desta forma, incluímos a quantificação deste gênero neste trabalho objetivando comparar os resultados de bactérias anaeróbias, com o gênero que achávamos ser predominante. Porém, os resultados deste trabalho mostraram que o gênero *Bifidobacterium* é o que aparece em maior quantidade entre as bactérias detectadas. Todas as crianças foram colonizadas com *Bifidobacterium* spp. e este gênero bacteriano, aparece em maior quantidade que outros grupos bacterianos, durante o primeiro ano de vida neste grupo de crianças, corroborando os dados já descritos na literatura (ADLERBERTH, 2009; PENDERS et al, 2006).

A complementação da amamentação com fórmulas suplementadas também favorece um aumento na quantidade de bactérias anaeróbias como *Bifidobacterium*

spp. e *Lactobacillus* spp., como descrito na literatura (VAEL; DESAGER, 2009). As bifidobactérias e os lactobacilos são bactérias probióticas, frequentemente usadas na produção de leites fermentados e seu uso está relacionado à prevenção de diarreias, infecções intestinais e inibição de patógenos em adultos (BARTOSCH et al, 2005; KLARE et al, 2007).

O gênero *Lactobacillus* foi encontrado em todas as crianças (Tabela 4) e em todos os intervalos de tempo, diferente do relatado por Jost et al. (2012), que em seu estudo com amostragem de 7 crianças, encontraram este gênero em pequena quantidade e com grande variação entre as amostras, mostrando a individualidade da composição da microbiota intestinal e sugerindo que estas bactérias são incapazes de manter uma população estável durante a vida.

A introdução precoce de alimentos sólidos também é descrita no histórico das crianças, como por exemplo, a criança 2, que foi alimentada aos 3 meses com frango, frutas, legumes e iogurte. Nesse período também passa a ser detectada a presença de *Lactococcus* spp. (gráfico 3). Nas demais crianças, alimentos sólidos foram introduzidos a partir dos 6 meses. Percebe-se uma pequena diminuição em relação à presença de bifidobactérias e lactobacilos nesse período, mas não é possível determinar relação com a presença de *Lactococcus* spp.

O uso de antibióticos e corticoides foi relatado no histórico clínico das crianças. Das dez crianças, seis fizeram uso de antibióticos (crianças 1, 3, 8, 12, 14 e 17), mas apenas na criança 12 foi possível observar uma diminuição da quantidade de bifidobactérias durante o período da administração do medicamento (aos 3 meses, gráfico 7) e, neste caso, a coleta da amostra coincidiu com o período de administração do antibiótico. As crianças 7, 8, 13 e 17 foram medicadas com corticoides, mas não foi possível determinar relação entre a administração do medicamento e diminuição da quantidade de bactérias durante a utilização do medicamento.

Os quadros infeciosos relatados no histórico das crianças revelam algumas doenças infecciosas como diarreias, infecções fúngicas orais ou resfriados nas crianças. Mas, nos períodos avaliados, estas infecções também não levaram a redução da microbiota avaliada.

A criança 17 (gráfico 11, Tabela 4) apresentou durante todos os tempos avaliados, independentemente da utilização de corticoides, uma quantidade menor de bifidobactérias em relação às outras crianças. Em seu histórico, foi diagnosticada

com urticária, além do histórico familiar de quadros alérgicos, como rinite. Este dado corrobora dados apresentados na literatura que mostram a relação entre a diminuição dessas bactérias em relação a outros componentes da microbiota e a ocorrência de alergias (VAEL; DESAGER, 2009).

Apesar de estar presente em todas as crianças, o gênero *Lactococcus*, foi encontrado em sete crianças (2, 8, 12, 13, 14, 15 e 17) já nas primeiras 24 horas, corroborando dados como de Park et al. (2005), que mostram a presença dessa bactéria desde as primeiras horas de vida. Também não foi possível determinar a relação entre a sua presença com hábitos alimentares, quadros infecciosos ou uso de medicamentos.

Observa-se que, entre as bactérias anaeróbias testadas, *Bifidobacterium* e *Lactococcus* mostraram menor variação de colonização entre 6 e 12 meses de idades, sugerindo que estes gêneros alcancem uma estabilização ao final do primeiro ano de vida.

O teste de presença/ausência para *Eubacterium* spp. mostrou a presença deste gênero bacteriano anaeróbio apenas nas crianças 7 e 13 e somente em alguns períodos, não sendo encontrado em todos os tempos analisados (Tabela 5). Este resultado também mostra diferença em relação à literatura, uma vez que alguns autores relatam que *Eubacterium* spp. é um dos principais componentes da microbiota intestinal (MAUKONEN et al, 2006). Este resultado também pode ser justificado pelo fato do iniciador utilizado não detectar todas as espécies do gênero.

Guilloteau et al. (2010) descrevem que existe um equilíbrio entre a existência das populações de *Bifidobacterium* spp. e *Eubacterium* spp., devido a processos metabólicos de *cross-feeding*. Os resultados deste trabalho, que mostram a rara presença de bactérias do gênero *Eubacterium*, sugerem que outros mecanismos estejam envolvidos na manutenção da microbiota que permitam a colonização por bifidobactérias.

A quantificação de bactérias totais foi realizada com o objetivo de traçar a proporção entre os gêneros estudados. Porém, os dados obtidos com base na quantificação de bactérias totais não foram utilizados neste trabalho, pois o número de cópias do gene 16S *rRNA* por célula bacteriana pode variar entre os micro-organismos. *Escherichia coli* possui 7 cópias do gene 16S *rRNA* (LEE; LEE; SHIN, 2008; ZHANG; SHAO; FANG, 2009), as espécies do gênero *Bifidobacterium* apresentam variações quanto ao número de cópias deste gene, podendo variar de 1

a 5 entre as espécies (CANDELA et al, 2004). Também existe variabilidade para *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp., variando de 1 a 6 (DE VRIES et al, 2006). Essas diferenças podem interferir na análise e não é possível determinar se a sequência representa apenas um micro-organismo ou se é apenas uma cópia de muitas do gene 16S *rRNA* (WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKBRANDT, 1997).

Os iniciadores utilizados para quantificação de bactérias totais não se mostraram específicos e uma desvantagem de utilizar iniciadores desenhados para atingir uma ampla gama de bactérias é a imprevisível variação do número de cópias do gene 16S *rRNA*, principalmente no caso de amostras como as de fezes, com uma grande quantidade de bactérias classificadas como não cultiváveis (RINTTILÄ et al, 2004). Por essa variabilidade, não foi possível calcular a totalidade de bactérias nas amostras ou definir a proporção entre as espécies pesquisadas.

Como não há um padrão do número de cópias do gene 16S *rRNA* dos gêneros estudados, optamos em representar os resultados em número de cópias totais por grama de fezes.

As amostras fecais dessas crianças também foram avaliadas pelo nosso grupo de pesquisas por outras técnicas moleculares como biblioteca genômica 16S *rRNA* e DGGE (CARVALHO, 2012; OLIVEIRA, 2011). A metodologia de qPCR, utilizada neste estudo, se mostrou complementar, permitindo a detecção de gêneros bacterianos, principalmente, *Bifidobacterium*, e *Lactobacillus*, presentes nessas amostras, mas não identificados por biblioteca genômica 16S *rRNA*. Foi possível, portanto, conhecer melhor a diversidade da microbiota fecal deste grupo de crianças ao longo do primeiro ano de vida, além de quantificar estas bactérias.

A diversidade, variabilidade individual e complexidade da microbiota intestinal têm sido avaliadas, recentemente, com o uso de técnicas moleculares, independente de cultura. A qPCR é a metodologia de escolha para a detecção e quantificação de bactérias específicas, através da utilização de iniciadores desenhados para reconhecer regiões específicas de *rRNA*. Esta técnica tem se mostrado mais sensível que o PCR clássico, inclusive por detectar células bacterianas por grama de amostra fecal em concentrações menores que na técnica convencional (FURET et al, 2009; FURRIE, 2006; MATHYS et al, 2008; MATSUKI et al, 2004; TURRONI et al, 2012).

Apesar do sistema TaqMan® ser mais específico pela utilização de sondas, o sistema SYBR®Green I também foi eficiente na detecção e quantificação de

bactérias, mostrando que os 2 sistemas podem ser usados para a identificação de bactérias.

Não foi possível definir um padrão da presença desses micro-organismos com o passar dos meses, mostrando que a microbiota é individual e está sujeita a interferências ambientais.

6. CONCLUSÃO

O método de qPCR mostrou eficiência na detecção e quantificação de bactérias anaeróbias presentes na microbiota fecal.

A quantificação de *E. coli* mostrou que esta bactéria, mesmo sendo encontrada em todas as crianças, aparece em menor quantidade que as bactérias anaeróbias pesquisadas, principalmente as bifidobactérias, diferentemente de estudos realizados a partir de bibliotecas genômicas que mostravam o predomínio de bactérias facultativas e ausência do gênero *Bifidobacterium*.

A quantificação de bactérias totais feita por qPCR utilizando-se iniciadores que amplificam o gene 16S *rRNA* não gera dados confiáveis devido ao número variável de cópias deste gene nos diferentes gêneros bacterianos.

Algumas relações foram traçadas entre a presença dos micro-organismos e alimentação, uso de antibióticos e outros medicamentos e ambiente e não foi possível definir um padrão da presença desses micro-organismos com o passar dos meses, mostrando que a microbiota é individual e está sujeita a interferências ambientais.

REFERÊNCIAS

ADLERBERTH, I. - Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica*, v.98, p.229-238, 2009.

ALTERMANN, E.; RUSSELL, W. M.; AZCARATE-PERIL, M.A.; BARRANGOU, R.; BUCK, B.L.; MCAULIFFE, O.; SOUTHER, N.; DOBSON, A.; DUONG, T.; CALLANAN, M.; LICK, S.; HAMRICK, A.; CANO, R.; KLAENHAMMER, T.R. - Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *PNAS*, v.102, n.11, p.3906–3912, 2005.

APPLIED (a). Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html?ICID=EDI-Lrn4>. Acesso em: 09 out. 2012.

APPLIED (b). Disponível em: <http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf>. Acesso em: 09 out. 2012.

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.

BARRANGOU, R.; BRICZINSKI, E.P.; TRAEGER, L.L.; LOQUASTO, J.R.; RICHARDS, M.; HORVATH, P.; COUTE-MONVOISIN, A.C.; LEYER, G.; RENDULIC, S.; STEELE, J.L.; BROADBENT, J.R.; OBERG, T.; DUDLEY, E.G.; SCHUSTER, S.; ROMERO, D.A.; ROBERTS, R.F. – Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04. *J. Bacteriol*, v.191, n.13, p.4144-4151, 2009.

BARTOSCH, S.; WOODMANSEY, E.J.; PATERSON, J.C.M.; MCMURDO, M.E.T.; MACFARLANE, G.T. – Microbiological effects of consuming a symbiotic containing

Bifidobacterium bifidum, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and couting of viable bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, v.40, p.28-37, 2005.

BENGMARK, S. – Gut microbial ecology in critical illness: is there a role for prebiotics, probiotics, and synbiotics? *Current Opinion in Critical Care*, v.8, p.145-151, 2002.

BLAUT, M.; COLLINS, M.D.; WELLING, G.W.; DORÉ, J.; VAN LOO, J.; DE VOS, W. - Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *British Journal of Nutrition*, v.87, Suppl. 2, p.S203-S211, 2002.

BOLOTIN, A.; WINCKER. P.; MAUGER, S.; JAILLON, O.; MALARME, K.; WEISSENBACH, J.; ERLICH, D.; SOROKIN, A. – The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, v.11, p.731-753, 2001.

BRANDT , K.; TADDEI, C., et al. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in brazilian newborns. *Clinics*, v.67, n.2, p.113-123, 2012.

CAICEDO, R.A., SCHANLER, R.J., LI, N., NEU, J. The developing intestinal ecosystem: implications for the neonate. *Pediatr Res*, v.58, n.4, p.625-8, 2005.

CANDELA, M.; VIATLI, B.; MATTEUZZI, D.; BRIGIDI, P. – Evaluation of the *rrn* operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, v.38, p.229-232, 2004.

CANNY, G.O.; MCCORMICK, B.A. – Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infection and Immunity*, p.3360-3373, 2008.

CARVALHO, I.I.R. - 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. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012.

DE MELLO, R.M.; DE MORAIS, M.B.; TAHAN, S.; MELLI, L.C.; RODRIGUES, M.S.; MELLO, C.S., RODRIGUES, M.S.C.; MELLO, C.S.; SCALETSKY, I.C.A. – Lactobacilli and bifidobacteria in the feces of schoolchildren of two different socioeconomic groups: children from a favela and children from a private school. *J Pediatr*, v.85, n.4, p.307-314, 2009.

DE VRIES, M.C.; SIEZEN, R.J.; WIJMAN, J.G.E.; ZHAO, Y.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W.M.; VAUGHAN, E.E. – Comparative and functional analysis of the rRNA-operons and their tRNA gene complement in different lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v.29, p.358-367, 2006.

DURFEE, T.; NELSON, R.; BALDWIN, S.; PLUNKETT, G.III; BURLAND, V.; MAU, B.; PETROSINO, J.F.; QIN, X.; MUZNY, D.M.; AYELE, M.; GIBBS, R.A.; CSORGO, B.; POSFAI, G.; WEINSTOCK, G.M.; BLATTNER, F.R. – The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol*, v.190, n.7, p.2597-2606, 2008.

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

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

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

FURET, J.P.; FIRMESSE, O.; GOURMELON, M.; BRIDONNEAU, C.; TAP, J.; MONDOT, S.; DORÉ, J.; CORTHIER, G. – Comparative assessment of humen and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol,* v.68, p.351-362, 2009.

FURRIE, E. - A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut*, v.55, n.2, p.141-143, 2006.

GARRETT, W.S.; GORDON, J.I.; GLIMCHER, L.H. - Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell*, v.140, n.6, p.859–870, 2010.

GASKINS, H.R.; CROIX, J.A.; NAKAMURA, N.; NAVA, G.M. – Impact of the intestinal microbiota on the development of mucosal defense. *Clinical Infectious Diseases*, v.46, p.S80-6, 2008.

GRÖNLUND, M.; LEHTONEN, O.; EROLA, E.; KERO, P. - Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v.28, n.1, p.19-25, 1999.

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

GUILLOTEAU, P.; MARTIN, L.; EECKHAUT, V.; DUCATELLE, R.; ZABIELSKI, R.; VAN IMMERSEEL, F. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, p.1-19, 2010.

HAARMAN, M.; KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*, p.2359-2365, 2006.

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

HERÍAS, M.V.; MIDTVEDT, T.; HANSON, L.A.; WOLD, A.E. – Role of Escherichia coli P fimbriae in intestinal colonization in gnotobiotic rats. *Infection and Immunity*, p.4781–4789, 1995.

HOOPER, L.V.; MACPHERSON, A.J. – Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Natures Rewiews Immunolgy*, v.10, p.159-169, 2010.

HOPKINS, M.J.; SHARP, R.; MACFARLANE, G.T. – Variation in human intestinal microbiota with age. *Digest Liver Dis*, v.34, Suppl.2, p.S12-8, 2002.

JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C.P.; CHASSARD, C. – New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. *PlosOne*, v.7. n.8. p.4495, 2012.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WERNER, G.; HUYS, G.; VANKERCKHOVEN, V.; KAHLMETER, G.; HILDEBRANDT, B.; MÜELLER-BERTLING, S.; WITTE, W.; GOOSSENS, H. – Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutricional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.59, p.900-912, 2007.

KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; ZOETENDAL, E.G.; VENEMA, K.; DE VOS, W.M.; SMIDT, H. – Tolls for the tract: understanding the functionality of the gastrointestinal tract. *Ther Adv Gastroenterol*, v.2, Suppl 1, p.S9-S22, 2009.

LARSEN, N.; VOGENSEN, F.K.; VAN DEN BERG, F.W.J.; NIELSEN, D.S.; ANDREASEN, A.S.; PEDERSEN, B.K.; AL-SOUD, W.A.; SORENSEN, S.J.; HANSEN, L.H.; JAKOBSEN, M. – Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PlosOne*, v.5, n.2, p.9085, 2010.

LEE, C.; LEE, S.; SHIN, S.G. – Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.78, p.371-376, 2008.

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

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

MARTEAU, P.; LEPAGE, P.; MANGIN, I.; SUAU, A.; DORÉ, J.; POCHART, P.; SEKSIK, P. – Review article: gut flora and inflammatory disease. *Aliment Pharmacol Ther*, v.20, Suppl. 4, p.18-23, 2004.

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

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; MIYAMOTO, Y.; TAKADA, T.; MATSUMOTO, K.; OYAIZU, H.; TANAKA, R. – Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied an Environmental Microbiology*,p. 5445-5451, 2002.

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

MAUKONEN, J.; MÄTTÖ, J.; SATOKARI, R.; SÖDERLUND, H.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. – PCR DGGE and RT-PCR DGGE show diversity and short-term temporal stability in the *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* group in the human intestinal microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*, v.58, p.517-528, 2006.

MAUKONEN, J.; SAARELA, M. – *Eubacterium*. In: Liu, D. editor. Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens. *CRC Press*, p. 391-403, 2011.

MCORIST, A.L.; JACKSON, M.; BIRD, A.R. – A comparision of five methods for extraction of bacterial DNA from human fecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, v.50, p.131-139, 2002.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. – The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Jornal de Pediatria*, v.82, n.5, p.189-197, 2006.

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

NOWROUZIAN, F.; HESSELMAR, B.; SAALMAN, R.; STRANNEGARD, I.L.; ABERG, N.; WOLD, A.E.; ADLERBERTH, I. – Escherichia coli in infants' intestinal microflora: colonization rate, satrin turnover, and virulence gene carriage. *Pediatric Research*, v.54, n.1, 2003.

OLIVEIRA, F.F. - Análise da diversidade da microbiota fecal de lactentes durante o primeiro ano de vida utilizando biblioteca *16S RNA*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011.

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*, v.41, Suppl 1, p.I/32-I/37, 2002.

PALMER, C.; BIK, E.M.; DIGIULIO, D.B.; RELMAN, D.A.; BROWN, P.O. – Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biology*, v.5, n.7, e.177. p.1556-1573, 2007.

PARK, H-H.; SHIM, S-S.; KIM, S-Y; PARK, J-H.; PARK, S-E.; KIM, H-J.; KANG, B-C.; KIM, C-M. – Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *The Journal of Microbiology*, v.43, n.4, p.345-353, 2005.

PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN DEN BRANDT, P.A.; STOBBERINGH, E.E. – Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, v.118, n.2, p.511-521, 2006.

RINTTILÄ, T.; KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS, L.; PALVA, A. - Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v.97, p.1166–1177, 2004.

SCHIFFRIN, E.J.; BLUM, S. - Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr*, v.56, Suppl 3, p.S60-S4, 2002.

SIPOS, R.; SZÉKELY, A.J.; PALATINSZKY, M.; RÉVÉSZ, S.; MÁRIALIGETI, K.; NIKOLAUSZ, M. – Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targetting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol Ecol*, v.60, n.2, p.341-50, 2007.

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

THOMPSON-CHAGOYÁN, O.C.; MALDONADO, J.; GIL, A. – Colonization and impacto f disease and other factors on intestinal microbiota. *Dig Dis Sci*, v.52, p.2069-2077, 2007.

TURRONI, F.; PEANO, C.; PASS, D.A.; FORONI, E.; SEVERGNINI, M.; CLAESSON, M.J.; KERR, C.; HOURIHANE, J.; MURRAY, D.; FULIGNI, F.; GUEIMONDE, M.; MARGOLLES, A.; DE BELLIS, G.; O'TOOLE, P.W.; VAN SINDEREN, D.; MARCHESI, J.R.; VENTURA, M. – Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLos ONE*, v.7, n.5, p.36957, 2012.

VAEL, C.; DESAGER, K. – The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr*, v.21, p.794-800, 2009.

VRIEZE A.; HOLLEMAN, F.; ZOETENDAL, E.G.; DE VOS, W.M.; HOEKSTRA, J.B.L.; NIEUWDORP, M. - The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, v.53, p.606–613, 2010.

WALL, R.; HUSSEY, S.G.; RYAN, C.A.; O'NEILL, M.; FITZGERALD, G.; STANTON, C.; ROSS, R.P. – Presence of two *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* probiotic strains in the neonatal ileum. *The ISME Journal*, v.2, p.83-91, 2008.

WINKLER, P.; GHADIMI, D.; SCHREZENMEIR, J.; KRAEHENBUHL, J.P. – Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J. nutr*, v.137, p.756S-772S, 2007.

WINTZINGERODE, F.V.; GÖBEL, U.B.; STACKEBRANDT, E. – Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Rewiews*, v.21, p.213-229, 1997.

ZHANG, T.; SHAO, M.-F.; FANG, H.H.-P. – A qRT-PCR-based method for the measurement of rrn operon copy number. *Letters in Applied Microbiology*, v.49, p.26-30, 2009.

ANEXO – Parecer do 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