

**NAIANE SAMIRA DE SOUZA CARDOSO**

**ANÁLISE DA MICROBIOTA FECAL DE CRIANÇAS ALÉRGICAS E  
NÃO ALÉRGICAS ÀS PROTEÍNAS DO LEITE DE VACA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2019

**NAIANE SAMIRA DE SOUZA CARDOSO**

**ANÁLISE DA MICROBIOTA FECAL DE CRIANÇAS ALÉRGICAS E  
NÃO ALÉRGICAS ÀS PROTEÍNAS DO LEITE DE VACA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

Coorientadora: Profa. Dra. Viviane Nakano

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos  
(*in memoriam*)

São Paulo  
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Souza Cardoso, Naiane Samira  
Análise da microbiota fecal de crianças alérgicas  
e não alérgicas as proteínas do leite de vaca /  
Naiane Samira Souza Cardoso; orientador Gabriel  
Padilla Maldonado; coorientadora Viviane Nakano. --  
São Paulo, 2019.  
92 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbiota intestinal. 2. Microbiota fecal.  
3. Alergia as proteínas do leite de vaca. 4. Alergia  
alimentar. 5. Crianças alérgicas. I. Padilla  
Maldonado, Gabriel, orientador. II. Nakano, Viviane  
, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidata: Naiane Samira de Souza Cardoso

Titulo de Dissertação: Análise da microbiota fecal de crianças alérgicas e não alérgicas às proteínas do leite de vaca

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

Coorientadora: Profa. Dra. Viviane Nakano

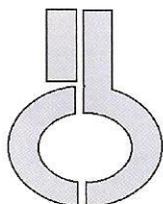
A comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de doutorado, em sessão publica realizada a...../...../....., considerou

**Aprovado (a)**

**Reprovado (a)**

Examinado (a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente (a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 03 de outubro de 2012.

PARECER 1072/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data APROVOU o projeto intitulado: "*Presença de Bifidobacterium spp., Bacteroides spp., Lactobacillus spp. e Clostridium spp. pertencentes na microbiologia intestinal de criança alérgica ao leite de vaca e saudáveis*" dos autores Prof. Prof. **MÁRIO JÚLIO ÁVILA CAMPOS** e aluna **NAIANE SAMIRA SOUZA CARDOSO**

Cabe a Pesquisadora executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **03.10.2013**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A.ZANOTTO

Coordenador da Comissão de *Ética em Pesquisas com Seres Humanos* - ICB/USP

Aos meus pais **Edineuza** e **Gildasio**, pela compreensão e incentivo fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao meu irmão **Kalipe**, nosso anjo azul, por toda sua luz.

Ao meu companheiro de vida **Janio**, por todo seu amor, carinho e dedicação, que só aumentaram com a espera da nossa semente de amor no mundo **Raul**, maior alegria de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu concluir esta etapa tão importante em minha vida profissional, e de realizar um sonho pessoal.

Em especial, ao Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos, pela oportunidade, orientação, paciência, e por toda a atenção que sempre recebi. Levarei seu exemplo de profissionalismo e o conhecimento que me foi passado pelo resto de minha vida, com muito carinho, sinto-me privilegiada por ter convivido com o senhor. Agradeço também, por ter acreditado em mim e na conclusão deste trabalho (*in memoriam*).

A minha coorientadora Profa. Dra. Viviane Nakano, pela orientação, dedicação, por todos os esclarecimentos nos momentos de dúvidas, obrigada por toda ajuda e carinho que me impulsionaram dentro e fora do laboratório.

Ao Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado por ter aceitado minha orientação nesse momento final da minha tese, após o falecimento do Prof. Mario, obrigada.

Ao Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP, em especial à Dra. Cristina Miuk Abe Jacobe, à Dra. Ana Paula B. Moschione Castro e a toda a equipe do ambulatório de imunologia desse Instituto.

A todas as crianças que participaram desta pesquisa, bem como seus responsáveis, gratidão e carinho por todos.

À Dra. Tania Alen Coutinho, pelo apoio inicial, pela torcida a cada prova, amizade, e por estar sempre disposta a contribuir com seus conhecimentos, sou-lhe muito grata.

À amiga Gabriela Gama Freire, pela companhia e cumplicidade que me ajudaram a continuar, seu incentivo nos momentos difíceis me ajudou a não desistir de finalizar este trabalho, você foi meu presente no doutorado!

À amiga Jacqueline Miranda, pela torcida e vibrações positivas.

À Miriam Rodriguez, pelos conhecimentos compartilhados e pela amizade que se iniciou durante este trabalho; À Viviane Arenas, pelos momentos de descontração, carinho e por compartilhar suas experiências em cada pedido de ajuda.

Aos antigos e novos integrantes do laboratório Aline Ignacio, Luis Llanco, Claudia Freire, Ana Paula Barbosa, Luciane Cavalheiro, Rita Lima, Paula Fernanda Betin, Felipe Menezes, Liliana Solis, Alejandra Guzmán, e Santiago Martin.

A auxiliar e Laboratório Márcia Harumi pelo suporte técnico e amizade.

À amiga Gabriela Soares Santos, pelo incentivo inicial e amizade.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia Gisele da Graça Santana e Naíde Farripas pela eficiência e atenção.

À Capes, pelo apoio financeiro concedido.

Finalmente, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

"A nossa recompensa está no esforço, não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa."

*Mahatma Gandhi*

"Até onde passo vou deixando o melhor de mim... Se alguém não viu, foi porque não me sentiu com o coração."

*Clarice Lispector*

## RESUMO

CARDOSO, N. S. **Análise da microbiota fecal de crianças alérgicas e não alérgicas às proteínas do leite de vaca.** 2019. 92 f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

A microbiota intestinal está envolvida na regulação de várias funções fisiológicas, incluindo a degradação de substâncias não digeríveis, produção de ácidos graxos de cadeia curta, redução da colonização de patógenos por conta da competição pelos sítios de adesão e permeabilidade intestinal. É composta predominantemente por bactérias anaeróbias sendo os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* os mais prevalentes. A composição da microbiota intestinal e fecal pode variar em quantidade e especificidade nos sítios anatômicos. Neste estudo foi analisada a composição bacteriana das microbiotas fecais em crianças com e sem alergia às proteínas do leite de vaca. Foi realizado o isolamento bacteriano para os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides/Parabacteroides* e *Clostridium*, análise quantitativa das fezes por PCR em Tempo Real e a filogenia por AP-PCR dos isolados de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* de ambos os grupos estudados. Das 25 fezes de crianças com alergia, 14 (56%) delas apresentaram espécies de *Lactobacillus*, 19 (76%) de *Bifidobacterium*, 15 (60%) de *Clostridium*, 24 (96%) de *Bacteroides* e/ou de *Parabacteroides*. Já no grupo de crianças não alérgicas 20 (80%) foram positivas para *Lactobacillus*, 23 (92%) para *Bifidobacterium*, 9 (36%) para *Clostridium*, 22 (88%) para *Bacteroides* e/ou *Parabacteroides*. Em ambos os grupos na faixa etária de 6 a 10 anos de idade, as amostras fecais apresentaram maior diversidade de espécies, observando-se a presença de *Lactobacillus* spp., *L. rhamnosus*, *L. casei*, *Bifidobacterium* spp., *B. infantis*, *Parabacteroides distasonis*, *Bacteroides fragilis*, *B. vulgatus*, *C. innocuum*, e *C. septicum*. A análise quantitativa dos microrganismos realizada nas fezes mostrou diferenças estatisticamente significativas para *Clostridium perfringens* ( $p = 0,037$ ), *Clostridium* Cluster I ( $p = 0,005$ ), *Escherichia coli* ( $p = 0,001$ ) e *Bacteroidetes* ( $p = 0,051$ ). Os dendrogramas obtidos com as espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* de ambos os grupos de crianças analisados, mostraram uma diversidade genética heterogênea e a presença de clones bacterianos, pertencentes na maioria das vezes, por bactérias isoladas do mesmo paciente. Na literatura mundial se observam escassos estudos sobre composição da microbiota intestinal e/ou fecal de crianças com alergia ao leite de vaca. Certamente,

este estudo comparativo poderá servir como base para pesquisas mais profundas nesta linha de investigação.

**Palavras chave:** Microbiota intestinal; Microbiota fecal; Alergia alimentar; Alergia as proteínas do leite de vaca; Crianças alérgicas.

## ABSTRACT

CARDOSO, N. S. **Fecal microbiota analysis of children allergic and non-allergic to cow's milk proteins.** 2019. 92 p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

The intestinal microbiota is involved in regulating of several physiologic functions, including the degradation of substances not digestible, production of fat acids of short chain, reduction of the colonization of pathogens due to the competition by the sites of adhesion and intestinal permeability. It is composed predominantly of anaerobic bacteria being the most prevalent phylum *Bacteroidetes* and *Firmicutes*. The composition of the intestinal and fecal microbiota may vary in quantity and specificity in anatomical sites. In this study we analyzed the bacterial composition of fecal microbiotas in children with and without allergy to cow's milk proteins. Bacterial isolation was performed for the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides/Parabacteroides* and *Clostridium*, quantitative analysis of feces by Real-time PCR and phylogeny by AP-PCR of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* isolates from both groups studied. Of the 25 feces of children with allergies, 14 (56%) of them presented *Lactobacillus* species, 19 (76%) of *Bifidobacterium*, 15 (60%) of *Clostridium*, 24 (96 %) of *Bacteroides* and/or *Parabacteroides*. In the group of non-allergic children 20 (80%) were positive for *Lactobacillus*, 23 (92%) for *Bifidobacterium*, 9 (36%) for *Clostridium*, 22 (88%) for *Bacteroides* and/or *Parabacteroides*. In both groups aged 6 to 10 years, fecal samples showed a greater diversity of species, observing the presence of *Lactobacillus* spp., *L. rhamnosus*, *L. casei*, *Bifidobacterium* spp., *B. infantis*, *Parabacteroides distasonis*, *Bacteroides fragilis*, *B. vulgatus*, *C. innocuum*, e *C. septicum*. The quantitative analysis of the microorganisms performed in the feces showed statistically significant differences for *Clostridium perfringens* ( $p = 0,037$ ), *Clostridium* Cluster I ( $p = 0,005$ ), *Escherichia coli* ( $p = 0,001$ ) e *Bacteroidetes* ( $p = 0,051$ ). The dendrograms obtained with the species of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* from both groups of children analyzed, showed heterogeneous genetic diversity and the presence of bacterial clones, belonging most of the time, by isolated bacteria from the same patient. In the worldwide literature, there are scarce studies on the composition of intestinal and/or fecal microbiota of children with cow's milk allergy. Certainly, this comparative study could serve as a basis for deeper research in this line of research.

**Keywords:** *Intestinal microbiota, Faecal microbiota, Food Allergy, Allergy the proteins of cow's milk, Allergic children.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Via clássica da reação de hipersensibilidade aos alimentos.....	25
<b>Figura 2</b> - Fluxograma simplificado do diagnóstico e tratamento de APLV.....	29
<b>Figura 3</b> - Curva padrão para <i>Escherichia coli</i> realizada com a cepa de referência <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	44
<b>Figura 4</b> - Curva padrão para <i>Bacteroidetes</i> realizada com <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29742.....	44
<b>Figura 5</b> - Curva padrão para <i>Lactobacillus</i> spp. realizada com <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356.....	44
<b>Figura 6</b> - Curva padrão para <i>Clostridium difficile</i> realizada com <i>C. difficile</i> VPI 10468.....	44
<b>Figura 7</b> - Curva padrão para <i>Bacteroidaceae</i> realizada com <i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482.....	45
<b>Figura 8</b> - Curva padrão para <i>Clostridium perfringens</i> realizada com <i>C. perfringens</i> ATCC 13124.....	45
<b>Figura 9</b> - Curva padrão para <i>Bifidobacterium</i> spp. realizada com <i>B. bifidum</i> ATCC 16.....	45
<b>Figura 10</b> - Curva padrão para <i>Clostridium</i> Cluster I realizado com <i>C. difficile</i> VPI 10468.....	45
<b>Figura 11</b> - Curva padrão para <i>Enterobacteriaceae</i> realizada com <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	46
<b>Figura 12</b> - Curva padrão para <i>Firmicutes</i> realizada com <i>C. perfringens</i> ATCC 13124.....	46
<b>Figura 13</b> - Curva padrão para <i>Archaea</i> realizada com <i>M. smithii</i> ATCC 35061.....	46
<b>Figura 14</b> - Dendrograma construído com as 45 espécies de <i>Lactobacillus</i> isoladas das amostras de crianças alérgicas.....	61
<b>Figura 15</b> - Dendrograma construído com as 76 espécies de <i>Lactobacillus</i> isoladas das amostras de crianças não alérgicas.....	62
<b>Figura 16</b> - Dendrograma construído com as 71 espécies de <i>Bifidobacterium</i> isoladas das amostras de crianças alérgicas.....	63
<b>Figura 17</b> - Dendrograma construído com as 86 isolados de <i>Bifidobacterium</i> das amostras de crianças não alérgicas.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Proteínas presentes no leite de vaca.....	26
<b>Tabela 2</b> - Oligonucleotídeos utilizados na detecção de espécies dos gêneros <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> .....	40
<b>Tabela 3</b> - Oligonucleotídeos utilizados na detecção de espécies de <i>Bacteroides</i> e <i>Parabacteroides</i> por PCR-Multiplex.....	41
<b>Tabela 4</b> - Oligonucleotídeos utilizados na detecção quantitativa bacteriana utilizando-se o sistema SYBR Green.....	43
<b>Tabela 5</b> - Dados demográficos e características clínicas das 25 crianças alérgicas e 25 não alérgicas às proteínas do leite de vaca.....	49
<b>Tabela 6</b> - Distribuição de espécies do gênero <i>Lactobacillus</i> identificadas nas amostras fecais de crianças alérgicas (25) e não alérgicas (25).....	50
<b>Tabela 7</b> - Distribuição de espécies do gênero <i>Bifidobacterium</i> identificadas nas amostras fecais de 25 crianças alérgicas e 25 não alérgicas.....	51
<b>Tabela 8</b> - Distribuição de espécies do gênero <i>Clostridium</i> identificadas nas 25 amostras fecais de crianças alérgicas e 25 não alérgicas.....	53
<b>Tabela 9</b> - Distribuição de espécies dos gêneros <i>Bacteroides</i> e <i>Parabacteroides</i> identificadas nas amostras fecais de 25 crianças alérgicas e 25 não alérgicas.....	54
<b>Tabela 10</b> - Número de amostras positivas e de espécies isoladas de acordo com a faixa etária em crianças alérgicas e não alérgicas.....	56
<b>Tabela 11</b> - Determinação quantitativa bacteriana nas amostras fecais das crianças alérgicas e não alérgicas. Valores expressos pela mediana.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA** - Alergia alimentar
- AGCC**- Ácidos graxos de cadeia curta
- ATCC** - *American type culture collection*
- AP-PCR**- *Arbitrary Primer- PCR*
- APLV** - Alergia à proteína do leite de vaca
- ASBAI** - Associação Brasileira de Alergia e Imunologia
- BI** - *Bifidobacterium infantis*
- BBE** - Ágar *Bacteroides fragilis*-bile-esculina
- BFM** - Meio *Bifidobacterium*
- BLAST** - *Basic local alignment search tool for nucleotides*
- CCFA** - Ágar ciclocerina cefoxitina frutose
- C.P** - *Clostridium perfringens*
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- dNTP** - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DCPC** - Duplo cego placebo controlado
- DRACMA** - *Diagnostic and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy*
- FPH** - Fórmula parcialmente hidrolisada
- FEH** - Fórmula extensamente hidrolisada
- FHA** - Fórmula hidrolisada de arroz
- FAA** - Fórmula de aminoácidos
- FS** - Fórmula de soja
- IgA** - Imunoglobulina A
- IgE** - Imunoglobulina E
- IgG** - Imunoglobulina G
- IL-4** – Interleucina-4
- IL-5** – Interleucina-5
- IL-9** – Interleucina-9
- IL-13** - Interleucina-13
- LA** - *Lactobacillus acidophilus*
- LV** - Leite de vaca
- NTSYS** - *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*
- PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**qPCR**- Quantitative PCR

**TGI** – Trato gastrintestinal

**Th1** – T helper 1

**Th2** – T helper 2

**TPO** - Teste de provocação oral

**TPOA** - Teste de provocação oral aberto

**TPODCPC** - Teste de provocação oral duplo cego placebo controlado

**TPOSC** - Teste de provocação oral simples cego

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  - Beta

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

$\text{Ca}^{++}$  - Cálcio

$\text{CO}_2$  - Dióxido de carbono

$\text{Fe}^{++}$  - Ferro

$k$  - *Kappa*

$\text{MgCl}_2$ - Cloreto de magnésio

$\text{mL}$ - Mililitro

$\text{mM}$ - Milimolar

$\text{mg}$  - Miligrama

$\text{mg/dia}$  - Miligrama por dia

$\text{mg/L}$  - Miligrama por litro

$\text{mg/dL}$  - Miligrama por decilitro

$\text{N}_2$  - Nitrogênio gasoso

$\text{ng}$ - Nanograma

$\text{nMol/L}$  - Nanomol por litro

$\text{pb}$ - Pares de bases

$\text{pH}$ - Potencial hidrogeniônico

$\mu\text{L}$ - Microlitro

$\mu\text{M}$ - Micromolar

$\mu\text{g/mL}$  - Micrograma por mililitro

$\gamma$  - Gama

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2 ANÁLISE DA LITERATURA</b> .....	22
<b>2.1 Alergias alimentares</b> .....	22
2.1.1 Leite de Vaca.....	25
2.1.2 Alergia às proteínas do Leite de Vaca.....	26
2.1.3 Cálcio.....	29
<b>2.2 Microbiota intestinal residente</b> .....	30
2.2.1 Microbiota intestinal envolvida nos processos alérgicos alimentares.....	34
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
<b>4.1 Participantes</b> .....	37
4.1.2 Dados clínicos dos participantes.....	37
4.1.3 Critérios utilizados para o diagnóstico de alergia à proteína do leite de vaca (APLV).....	38
<b>4.2 Amostras fecais</b> .....	38
<b>4.3 Isolamento e identificação bacteriana</b> .....	38
<b>4.4 Detecção molecular bacteriana</b> .....	39
4.4.1 Extração do DNA bacteriano.....	39
4.4.2 Detecção qualitativa bacteriana por PCR.....	39
4.4.3 Quantificação bacteriana por PCR em Tempo Real (q-PCR).....	41
<b>4.5 Tipagem Molecular</b> .....	46
<b>4.6 Análises Estatísticas</b> .....	47
<b>5 RESULTADOS</b> .....	48
5.1 Isolamento e identificação.....	48
5.2 Análise bacteriana quantitativa por qPCR das amostras fecais.....	57
5.3 Diversidade genética.....	58
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	74
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75

## 1. INTRODUÇÃO

A alergia ou hipersensibilidade alimentar constitui-se uma resposta imunológica adversa às proteínas presentes nos alimentos, causando vários sintomas ao paciente (WASERMAN e WATSON, 2011). Existem outras reações adversas aos alimentos que podem ocorrer sem o envolvimento do sistema imune do hospedeiro, tais como: deficiências enzimáticas digestivas (ex.: intolerância à lactose) e presença de toxinas (ex.: intoxicação alimentar por estafilococos), entre outras (FERREIRA et al., 2007).

Embora a alergia alimentar possa ser desencadeada por praticamente a maioria dos alimentos, os mais significativos são: leite de vaca, ovo, amendoim, mariscos, peixes, trigo e soja (RONA et al., 2007; TAYLOR-BLACK e WANG, 2012). Dentre eles, a alergia ao leite de vaca é a que apresenta maior prevalência, por ser o primeiro alimento introduzido na dieta em idade pediátrica, e pelo seu elevado potencial alergênico. As reações alérgicas causadas pelas proteínas presentes no leite de vaca (LV) podem ou não ser mediadas pela imunoglobulina E (IgE), a qual produz sintomas característicos em cada tipo de reação alérgica (HEINE et al., 2002; BRILL et al., 2008; JEONG et al., 2017). Também fatores genéticos, assim como a quantidade e frequência de exposição aos alérgenos alimentares podem influenciar uma resposta alérgica observada nos primeiros anos de vida.

Os indivíduos alérgicos às proteínas do leite de vaca são submetidos a uma dieta de exclusão do leite e derivados, a fim de eliminar ou amenizar os sintomas. A eliminação de alguns componentes do LV na dieta de crianças, como por exemplo, o cálcio e a lactose, podem levar à deficiência de crescimento da criança e à disbiose da microbiota intestinal, aumentando o risco de desenvolver futuramente outras patologias (ISOLAURI et al., 1998; TURNBAUGH et al., 2007).

A microbiota intestinal é o conjunto de microrganismos presentes no trato gastrintestinal de humanos e animais, e o seu desequilíbrio tem sido associado às doenças intestinais, tais como: doenças inflamatórias do intestino, síndrome do intestino irritável, doença celíaca e alergias (GAREAU et al., 2010).

Alguns pesquisadores relacionaram o papel da microbiota intestinal com a indução à tolerância oral envolvida na patogênese da alergia alimentar, devido ao estímulo e desenvolvimento do sistema imunológico; além de também estar

envolvida com a resistência às infecções produzidas por diversos patógenos (CONWAY, 2005; O'HARA et al., 2006; ARRIETA et al., 2015). Sabe-se que, no trato intestinal, existe um estado de constante modulação, pois ao mesmo tempo em que o sistema imunológico está pronto para agir contra bactérias patogênicas, também é capaz de se manter tolerante em relação à microbiota residente (WINKLER et al., 2007; AITORO et al., 2017).

Determinados microrganismos vivos, quando ingeridos em certas quantidades podem trazer benefícios à saúde, são os denominados probióticos, como por exemplo, algumas espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Estudos demonstraram a capacidade de *Bifidobacterium* spp. utilizar oligossacarídeos fucosilados do leite humano, e favorecer seu crescimento em relação a outras bactérias que fazem parte da microbiota intestinal, tais como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (DETHLEFSEN e RELMAN, 2011; MARCOBAI et al., 2011).

Espécies de *Bacteroides* também podem utilizar oligossacarídeos fucosilados como fonte de carbono, o que sugere que a colonização do intestino é auxiliada pelas propriedades do leite, realçando a importância da dieta na determinação da composição da microbiota intestinal humana (MARCOBAI et al., 2011).

Existem evidências de que indivíduos portadores de enfermidades, como doença intestinal inflamatória ou alergias, apresentam microbiota intestinal diferente dos indivíduos saudáveis, com baixa diversidade microbiana. Porém, na maioria dos casos, não é possível afirmar se essa diferença na composição microbiana é característica de algum determinado quadro clínico. Isto sugere maiores estudos para definir as diferenças qualitativas e quantitativas da composição desta microbiota (BISGAARD et al., 2011; AITORO et al., 2017; VAN DEN ELSEN et al., 2019).

Na literatura mundial, são escassos os estudos sobre a composição da microbiota intestinal de crianças com alergia ao leite de vaca. Assim, a identificação da composição dessa microbiota residente poderá fornecer o suporte microbiológico necessário para melhor conhecer o impacto que a exclusão do leite de vaca pode provocar.

## 2 ANÁLISE DA LITERATURA

### 2.1 Alergias alimentares

Nas últimas décadas houve um aumento na prevalência dos casos de diversas alergias em todo o mundo, incluindo as alergias alimentares (AA). Este aumento tem sido atribuído às mudanças no estilo de vida da população e ao consumo de alimentos processados, porém são múltiplos os fatores que podem causar ou aumentar o risco de desenvolver AA, dentre eles, fatores genéticos, composição da microbiota intestinal, tipo de amamentação, quantidade de exposição aos alérgenos (SICHERER e SAMPSON, 2006; BRANUM e LUKAS, 2009).

Estudos têm associado a introdução precoce de potenciais alérgenos na dieta como LV, ovos e amendoim, com o desenvolvimento de alergias (SCHIESS et al., 2011; SHAKER, 2014). Por outro lado, outros estudos mostram que a introdução tardia desses alimentos também pode aumentar o risco de desenvolver alergias (FLOKSTRA DE BLOK et al., 2010), sendo necessários mais estudos que esclareçam uma dose adequada ou um período crítico na infância para a introdução na dieta desses alimentos considerados alergênicos.

As alergias alimentares tornaram-se um problema de saúde pública e são associadas a um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes alérgicos, devido aos sintomas e outras comorbidades associadas como: asma, eczema pulmonar, dermatite atópica, e hipersensibilidade, entre outras (SAMPSON, 2004; NOWAK-WEGRZYNE e SAMPSON, 2006; FLOKSTRA DE BLOK et al., 2010).

A prevalência assertiva desta patologia é dificultada pelo seu difícil diagnóstico, pois se manifesta com perfis diferentes de sintomas (indivíduo dependente), podendo apresentar reações severas e até fatais. As alergias aos alimentos são mais comuns na idade pediátrica, sendo estimado que afete 10% das crianças e 6% dos adultos em todo o mundo (JEONG et al., 2017).

O alérgeno (antígeno) geralmente é uma proteína e pode ser exposta por contato com a pele e mucosa, e mais comumente com o trato gastrointestinal por ingestão. A barreira gastrointestinal de crianças pequenas e bebês é imatura, e nas alérgicas o quadro é agravado, pois o sistema imunológico não consegue impedir a absorção da maioria dos antígenos, e por conta disso, se observa maior prevalência

de crianças alérgicas nos primeiros anos de vida (DUPONT, 2011; SICHERER, 2011; GRAY et al., 2015).

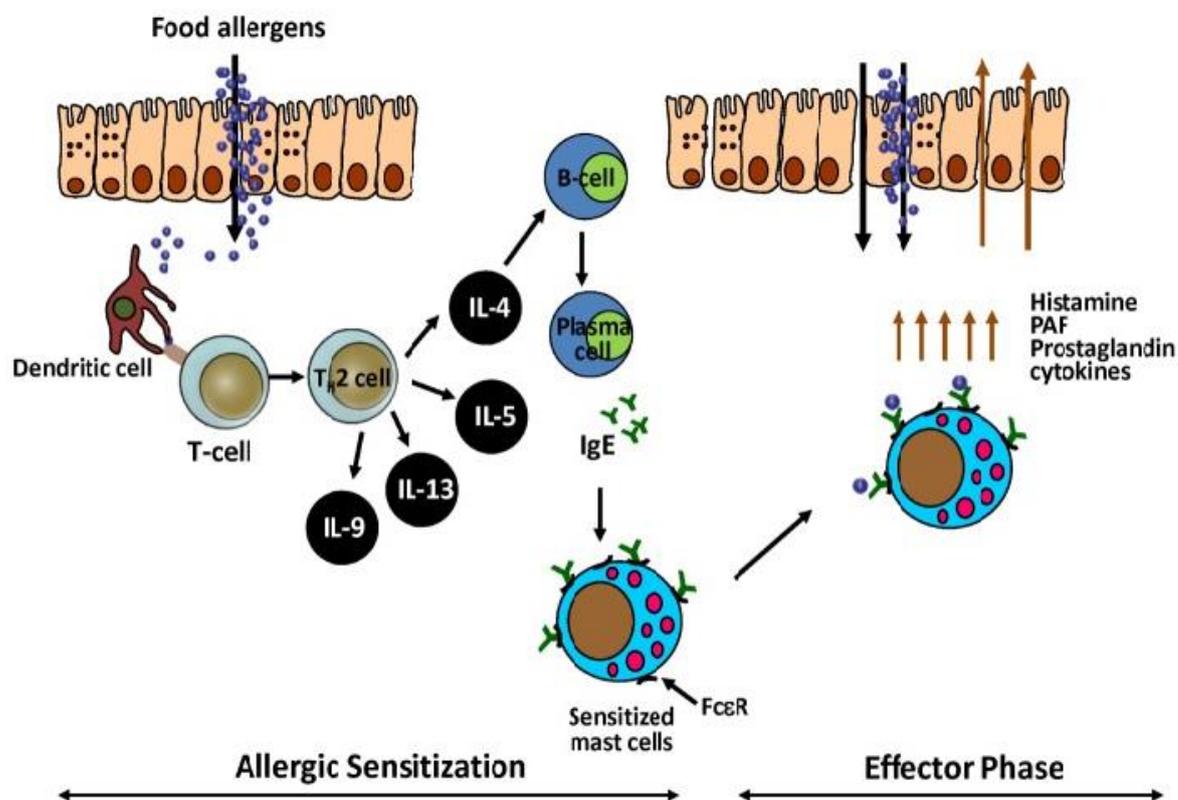
As reações de hipersensibilidade aos alimentos podem ser classificadas de acordo com o mecanismo imunológico, e podem ser ou não mediadas pela IgE. Os sintomas produzidos por esta imunoglobulina são edema de laringe, dermatite atópica, rinoconjutivite, náuseas e vômitos; já nas reações não mediadas por IgE, os sintomas são tardios, mais severos e incluem complicações respiratórias e gastrintestinais (FIOCCHI et al., 2010; MORIYAMA, 2015).

O mecanismo imunológico mais comum nesses processos é a reação mediada por IgE, onde basicamente, os antígenos se ligam aos anticorpos estimulando a liberação de histamina e as células Th2 induzindo à síntese de IgE (hipersensibilidade tipo I); entretanto, as raras reações não mediadas por IgE são multifatoriais e incluem anticorpos IgA e IgG que se ligam aos antígenos das proteínas (hipersensibilidade tipo III), desencadeando um estímulo direto das células T (hipersensibilidade tipo IV) (KWEOM et al., 2000; ABBAS et al., 2014).

Lee (2016) descreve a via clássica da reação alérgica mais comum, sendo considerado um processo de dois passos: a sensibilização e a reação de hipersensibilidade. As proteínas alimentares atravessam a barreira epitelial e são apresentadas por células apresentadoras de antígenos, na presença de IL-4, as células T CD4 diferenciam-se em células Th2 que produzem outras interleucinas (IL-5, IL-13, IL-9 e IL-4) que promovem a diferenciação das células B em células plasmáticas produtoras de IgE com a liberação de histaminas (Figura 1).

A história clínica de alergias relatada pelo paciente é muito importante sendo necessários também outros exames clínicos e testes imunológicos como, RAST® e immunoCAP® que servem para mensurar os níveis séricos de IgE específico para o alimento suspeito (DAHER et al., 2009).

O teste Prick Test, tem a mesma finalidade de pesquisa de IgE no soro; e consiste num teste cutâneo onde as proteínas do alimento suspeito são apresentadas à superfície da pele, a fim de verificar o aparecimento de pápulas no local. Essas pápulas são medidas após 20 minutos e valores  $\geq 3$  mm são consideradas positivas de reação alérgica (BOUSQUET et al., 2012; MURANO, 2014).



**Figura 1** - Via clássica da reação de hipersensibilidade aos alimentos. Fonte: Adaptado de Lee (2016).

O teste de provocação oral é usado, na maioria das vezes, para concluir o diagnóstico quando não se trata de um caso de anafilaxia. Nesse teste o alimento suspeito é administrado ao paciente, sob supervisão médica, com objetivo de confirmar alguma reação clínica. Quando se trata de uma reação alérgica IgE mediada, a reação clínica pode ser verificada imediatamente ou em algumas horas; já uma reação alérgica não mediada por IgE, pode apresentar complicações em 24 horas ou até em dias (DUPONT, 2011; MURANO, 2014).

Na maioria dos casos, as alergias alimentares são perdidas até os cinco anos de idade, e é quando pode ser adquirida a tolerância oral, sendo constituída como um estado de falta de resposta imune sistêmica e local induzida pelo alimento (ROBERT, 2003; FLOKSTRA DE BLOK et al., 2010).

### 2.1.1 Leite de Vaca

O leite de vaca (LV) é um produto de secreção mamária constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão (SGARBIERI, 1996). O leite e seus derivados são alimentos com elevado valor nutricional: proteínas, minerais, vitaminas, e outros constituintes que em conjunto, suprem as necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido (MUNIZ et al., 2013).

A composição do LV pode ser variável dependendo do metabolismo do animal em que foi produzido, mas em média é constituído por 87% de água e 13% de sólidos totais, onde estão distribuídos de 4% - 5% de carboidratos, 3% de proteínas, 3% - 4% de lipídios, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas (NORO et al., 2006).

Este alimento está entre os mais consumidos no mundo, e seu consumo é incentivado principalmente como fonte de cálcio, que dentre outras funções, participa da formação e manutenção da estrutura óssea. Outros minerais importantes como fósforo, magnésio, zinco e selênio, também fazem parte da sua constituição (GOLDBOHM et al., 2011; MUNIZ et al., 2013).

A lactose constitui-se o carboidrato mais abundante no LV. A sua digestão e absorção é realizada pela ação da enzima lactase produzida no intestino; pessoas com ausência ou baixa atividade desta enzima sofrem de intolerância à lactose, o que causa desconforto abdominal, diarreia, entre outros sintomas (USAI-SATTA et al., 2012; VANDENPLAS, 2015).

Com relação às vitaminas do LV, a vitamina A é necessária na manutenção e multiplicação celular, e a vitamina B2 (riboflavina) atua como coenzima nos processos metabólicos da cadeia respiratória. Sabe-se também que, imunoglobulinas, hormônios, citocinas e enzimas do LV podem conferir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (PEREIRA, 2014).

Várias proteínas estão presentes no LV, compreendendo aproximadamente 35 g/L (Tabela 1), sendo os peptídeos formados na digestão protéica associados a vários benefícios à saúde, auxiliando na absorção de nutrientes, vitaminas, e minerais no trato gastrointestinal (MILLS et al., 2011; SOUZA et al., 2012). Estudos apontam que crianças com dieta de exclusão do LV desenvolvem hipocrescimento, níveis baixos de cálcio na corrente sanguínea e desnutrição (MORAL e NAVES,

2017).

**Tabela 1** - Proteínas presentes no leite de vaca.

Fração Protéica	Proteínas	(g/L)
Caseínas	<b>PM (kDa)</b>	~30
	$\alpha_{s1}$ -caseína – (23,6)	12 - 15
	$\alpha_{s2}$ -caseína – (25,2)	3 - 4
	$\beta$ - caseína – (24)	9 - 11
	$\gamma_1$ - caseína – (20,6)	1 - 2
	$\gamma_2$ - caseína – (11,8)	-
	$\gamma_3$ - caseína – (11,8)	-
	k- caseína – (19)	3 - 4
Proteínas do soro		~ 5
	$\alpha$ -lactoalbumina - (14,2)	1 – 1,5
	$\beta$ -lactoglobulina - (18,3)	3 - 4
	Imunoglobulinas- (160)	0,6 - 1
	BSA* - (67)	0,1 – 0,4
	Lactoferrina - (800)	0,1

\*Albuminas do soro bovino.

Fonte: Adaptado de FIOCCHI et al. (2010) (DRACMA).

### 2.1.2 Alergia às proteínas do leite de vaca

Reações alérgicas podem ser desencadeadas pela fração protéica do leite, estima-se que em nível mundial, a alergia às proteínas do leite de vaca (APLV) afete de 3% a 8% das crianças menores de três anos de idade, e até 4% dos adultos em todo o mundo (SICHERER et al., 2011; SANTALHA et al., 2013). Estudos demonstram que a maior prevalência desses processos, ocorre durante o primeiro ano de vida, e aproximadamente, 80% destas crianças adquirem tolerância oral espontaneamente até os cinco anos de idade (CAFFARELLI et al., 2010 ; WOOD et

al., 2013; GRAY et al., 2015). A amamentação é fortemente recomendada como a melhor forma de se evitar AL, porém, crianças que tendem a desenvolver alergias ao LV também apresentam reações às proteínas do leite ingeridas pela mãe (SHAKER, 2014; SCHIESS et al., 2011).

Da mesma forma que em qualquer outra alergia alimentar, o diagnóstico de APLV se baseia principalmente na história clínica relatada pelo paciente e seus familiares, sendo de importância a informação da presença de alérgicos na família (ELE et al., 2017). Exames clínicos e imunológicos são realizados a fim de pesquisar os níveis séricos de IgE e também testes de provocação oral.

Os testes de provocação oral (TPO) podem ser realizados de três formas: 1) aberto (TPOA), quando o leite é oferecido normalmente com o conhecimento do paciente, familiar e médicos; 2) simples cego (TPOSC), quando o leite é mascarado em sua aparência, sabor, odor e consistência, de forma que apenas os médicos sabem qual porção ou dose; e 3) duplo cego, placebo controlado (TPO DCPC) no qual o leite e placebo são preparados e codificados por uma terceira pessoa não envolvida na avaliação do paciente, reduzindo a influência do paciente e acompanhante (ASBAI, 2012; GUSHKEN et al., 2013).

Estudos referentes a novos produtos alimentícios, bem como formas de processamento do LV vêm sendo realizados, além disso, há muito tempo os probióticos vêm sido investigados na busca de modular a microbiota intestinal/fecal e induzir tolerância oral em alérgicos ao LV (LATTINEN et al., 2005). Entretanto, o procedimento eficaz adotado pelos clínicos é a exclusão total do LV e derivados da dieta do paciente, a fim de eliminar ou amenizar os sintomas. Além disso, o impacto nutricional individual deve ser avaliado, com a implementação de reposição de nutrientes, quando necessário (TURNBAUGH et al., 2017; VENTER et al., 2017; INOU et al., 2019).

Das proteínas presentes no leite de vaca, as mais relacionadas com as alergias são as caseínas e as proteínas do soro  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina. As caseínas são resistentes ao processamento térmico, fazendo com que os APLV sensibilizados por esta proteína excluam também a forma cozida do leite e derivados (FIOCCHI et al., 2016). A  $\beta$ -lactoglobulina é encontrada no leite materno humano, e pode ser detectada no leite da mãe até sete dias após sua ingestão, e esta

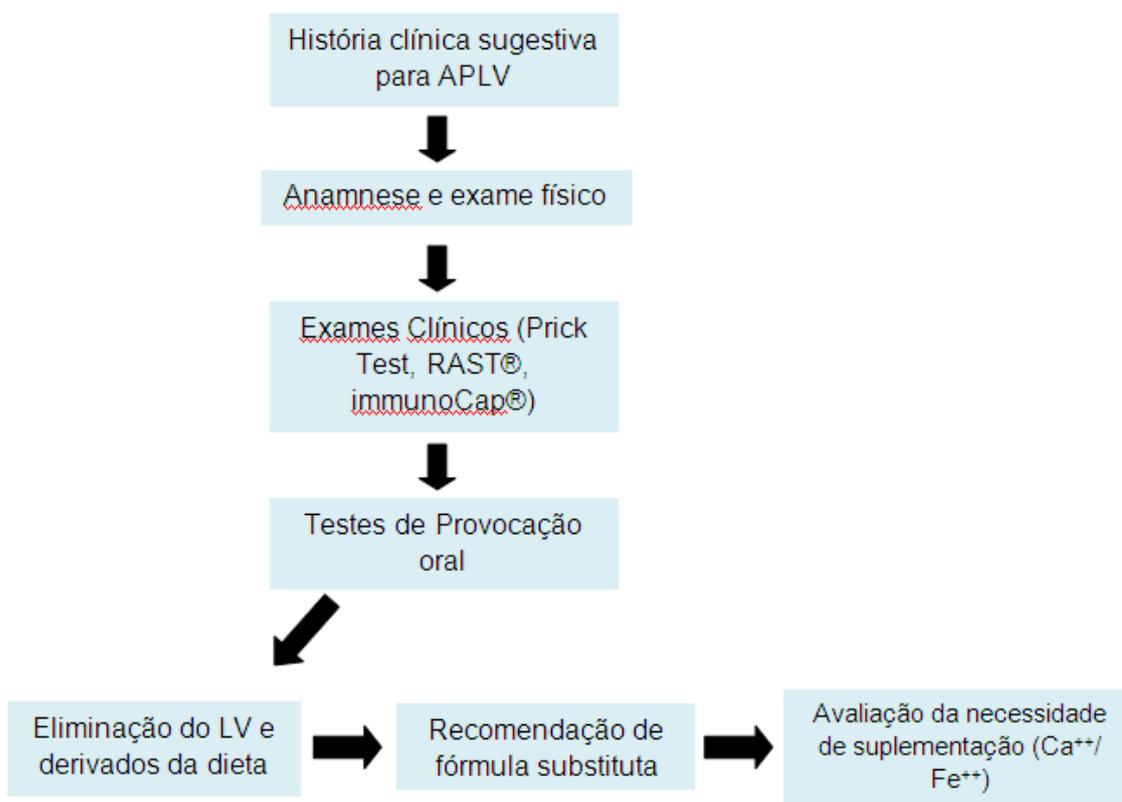
informação é importante, pois lactantes APLV podem continuar se alimentando com leite materno desde que a mãe faça a dieta de exclusão (MATANGKASOMBUT et al., 2017).

A maioria dos indivíduos com APLV são sensibilizados tanto para caseínas quanto para proteínas de soro (BARTUZI et al., 2017). Uncuoglu et al. (2017) testaram a tolerância ao leite cozido e fermentado (iogurte) em ALPV e independente das proteínas que causavam a sensibilização em cada criança, assim, 2/3 das crianças menores de dois anos com reação não mediada por IgE toleraram o leite fermentado, mostrando que além da proteína sensibilizante, ainda existem fatores como: idade, tipo de reação e a condição física do LV. Quando a amamentação exclusiva não é possível, ou a criança com APLV já passou da idade de lactente, deve receber indicação de uma fórmula substitutiva ao LV (KANSU, 2016).

De acordo com as diretrizes da DRACMA (*Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy*), a fórmula parcialmente hidrolisada (FPH) pode ser recomendada como substituta do LV comum, porém, algumas crianças podem ser sensíveis a esse produto uma vez que pode conter alguns epítomos intactos capazes de provocar a reação alérgica (FIOCCHI, A. et al., 2010).

Fórmulas parcialmente hidrolisadas utilizadas como substitutas do LV comum, foram testadas em ratos sensíveis e os níveis de IgE e IgG específicos diminuíram, assim como também não houveram sintomas clínicos. Este efeito imunomodulador foi associado ao aumento de células B e T reguladoras no baço (KIEWIET et al., 2017).

A fórmula extensamente hidrolisada (FEH) é a mais recomendada, como substituta do LV comum, é bem tolerada no que diz respeito às reações alérgicas, mas não possui gosto agradável, além do elevado custo. A fórmula hidrolisada de arroz (FHA) é considerada equivalente a FEH; e a fórmula de aminoácidos (FAA) é sugerida somente em situações clínicas severas ou em pacientes que não se adaptaram às outras fórmulas, podendo ser outra opção fórmulas a base de soja (FS). O fluxograma simplificado sobre o diagnóstico e pós diagnóstico da APLV é mostrado na Figura 2 (MIRAGLIA DEL GIUDICE et al., 2015; FIOCCHI et al., 2016; INOU et al., 2019).



**Figura 2.** Fluxograma simplificado do diagnóstico e tratamento de APLV. Fonte: Adaptado de BRILL (2008) e KANSU et al. (2016).

### 2.1.3 Cálcio

O cálcio é um mineral essencial responsável pela constituição dos tecidos duros, tais como ossos, e é fundamental na manutenção das diversas funções no organismo, como a contração muscular, transmissão de impulsos nervosos, e coagulação do sangue. Com isto, é necessário que os níveis séricos de cálcio estejam dentro da normalidade para o bom funcionamento do organismo em indivíduos saudáveis, sendo os valores normais em crianças é entre 8,5 e 11 mg/dL (2,1 e 2,9 nM/L) (BALDO, 2008; IOM, 2010).

A ingestão dietética recomendada de cálcio é de 200 mg/dia para crianças de 0 a 6 meses, 260 mg/dia para crianças de 7 a 12 meses, 700 mg/dia para crianças de 1 a 3 anos, e 1000 mg/dia para de crianças de 4 a 8 anos, sendo o limite superior tolerável 2.500 mg/dia em todas as idades (FERNANDÉZ-ORTEGA, 2008). A disponibilidade do cálcio nos alimentos é

variada, estando presente, por exemplo, em brócolis, sardinha, banana e gergelim; porém, o leite de vaca e seus derivados são as fontes mais ricas desse elemento (BUZINARO et al., 2006).

A quantidade de cálcio presente no leite é de aproximadamente 1.200 mg/L ou 240 mg por copo (200 mL) (PHILIPPI, 2013). Desta forma, o baixo consumo de leite é associado a níveis inadequados de cálcio, observados em países desenvolvidos e emergentes (FERNANDÉZ-ORTEGA, 2008; HOPPU et al., 2010; VERTER et al., 2017).

Há uma correlação entre a absorção de cálcio no organismo e os níveis de vitamina D, que controla a absorção desse mineral; entretanto, alguns componentes do LV, como a lactose, proteínas e fosfolipídios, podem contribuir para a absorção do cálcio no intestino, mantendo-o na forma solúvel até que alcance o intestino grosso e seja absorvido por vias independentes à vitamina D (MARTINI et al., 2013).

Dentre outros prejuízos ao organismo, uma dieta pobre em cálcio, pode prejudicar a formação do esqueleto e o processo de crescimento, visto que, o tecido ósseo se desenvolve na primeira infância. A suplementação de cálcio é o recurso utilizado quando há a necessidade individual de crianças que fazem dieta de exclusão de LV e derivados (BUENO e CZEPIELEWSKI, 2008; VERTER et al., 2017).

## **2.2 Microbiota intestinal residente**

As comunidades microbianas presentes internamente ou superficialmente no corpo humano são denominadas de microbiota residente, indígena ou autóctone, e o trato intestinal abriga uma variedade elevada de microrganismos quando comparado a outros ecossistemas do corpo humano como a pele, vagina, e cavidade bucal (TURNBAUGH et al., 2017). A microbiota residente gastrintestinal humana é muito complexa e é composta por microrganismos que interagem intimamente com as células e os nutrientes do hospedeiro (CAICEDO et al., 2005).

A microbiota intestinal residente pode ser definida pela presença de gêneros microbianos que colaboram com o metabolismo, resistência às infecções e inflamações, resistência à autoimunidade, sinalização endócrina, e função cerebral (eixo cérebro-intestino) (BISGAARD et al., 2011). Exemplos de bactérias associadas

à saúde humana e adequada função do trato gastrointestinal incluem: *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* Clusters IV e XIV, *Eubacterium* spp., *Faecalibacterium* spp., *Lactobacillus* spp., e *Roseburia* spp. (LE CHATELIER et al., 2013).

A colonização bacteriana é um processo que ocorre nos primeiros meses de vida, juntamente com o desenvolvimento intestinal e maturação do sistema imunológico. Em 1886, Theodor Ercherich, em estudo pioneiro, observou a esterilidade no mecônio (primeira evacuação do recém-nascido), e relatou que a colonização bacteriana seria pelo contato materno e ambiental (SHULMAN et al., 2007). Com isso, acreditava-se que os seres humanos eram livres de microrganismos antes do nascimento, mas nos últimos anos estudos vêm sugerindo que a colonização bacteriana pode ser iniciada antes do nascimento, dentro do útero, criando a hipótese do “Dogma do útero materno” que propõem que esse ambiente talvez não seja isento de microrganismos (FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013).

A detecção bacteriana por cultivo fecal de neonatos saudáveis, e por PCR 16S rRNA mostrou uma comunidade relativamente simples, composta por gêneros como *Escherichia*, *Shigella*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (JIMENEZ et al., 2008). Também, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, e *Lactobacillus rhamnosus* têm sido detectadas em sangue do cordão umbilical e em anexos placentários; porém, os mecanismos pelos quais estas bactérias colonizam esses locais não foram elucidados (JIMENÉZ et al., 2008; SATOKARI et al., 2009; BUTEL et al., 2018).

A composição microbiana intestinal é única para cada indivíduo; entretanto, têm sido observados quatro filos predominantes, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. (LANDMAN et al., 2015). Sabe-se que, o tipo de nascimento pode influenciar na composição da microbiota, os bebês nascidos de parto normal possuem elevado número de *Lactobacillus* spp. pela sua presença no canal vaginal materno; enquanto, aqueles nascidos por cesariana possuem colonização inicial de bactérias facultativas e esporuladas, as quais estão presentes na pele da mãe, ambiente hospitalar, e profissionais de saúde (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010).

Rutayisire et al. (2016), em pesquisa comparativa da microbiota intestinal de bebês nascidos de parto normal e cesárea, observaram diferenças significativas na colonização durante os primeiros três meses de idade; porém essas diferenças na diversidade bacteriana foram diminuídas a partir dos seis meses de vida, principalmente, nos gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Lactobacillus*, com maior número de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

A amamentação é outro fator importante na formação da microbiota intestinal, o leite materno transmite bactérias ao intestino do lactente, confere proteção contra espécies patogênicas por conter anticorpos, e seleciona espécies que são capazes de utilizar os oligossacarídeos de leite como fonte de carbono. Isto é observado em *Bifidobacterium longum* que apresenta capacidade de crescer mais rapidamente que outras bactérias, como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*. Várias espécies de *Bacteroides* também podem utilizar oligossacarídeos fucosilados como fontes de carbono, mostrando que a colonização é auxiliada pela capacidade prebiótica do leite. Em recém-nascidos alimentados com leite artificial observa-se uma maior quantidade de *Clostridium* spp. e *Enterococcus* spp. (YU et al., 2013).

Em lactentes, as espécies de *Bifidobacterium* mais comuns são *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. infantis* e *B. catenulatum*; contudo, composição similar também é observada em adultos. Dentre do gênero *Bacteroides*, espécies do “grupo *Bacteroides fragilis*” são abundantes tanto em crianças quanto em adultos. Microrganismos espopulados como *C. perfringens*, *C. paraputrificum*, *C. tertium* do Cluster Clostridial I e *C. difficile*, Clusters Clostridial XI, são dominantes em crianças com idade escolar (MEVISSSEN-VERHAGE et al., 1987).

A composição da microbiota é alterada em dois estágios da vida: no início da vida até o desmame, e do desmame até a idade adulta, influenciada, principalmente pela dieta e estilo de vida. Sabe-se que, espécies pioneiras que colonizam os neonatos são bactérias facultativas como: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Enterobacter* spp., as quais são responsáveis por criar um ambiente anóxico, favorecendo o crescimento de bactérias anaeróbias como, *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., e *Eubacterium* spp. (JIMÉNEZ et al., 2008; BACKED et al., 2015).

No trato gastrintestinal, a composição é característica em cada sítio anatômico, sendo que, o intestino grosso abriga uma comunidade microbiana

complexa e densa, composta principalmente por espécies anaeróbias ( $10^{12}$  bactérias/mL) (PRAKASH et al., 2011; ARON-WISNEWSKY et al., 2012).

Por existirem diferenças nas populações microbianas que habitam a região superior e inferior do intestino, o material fecal torna-se alvo de análises da sua composição, representando a microbiota intestinal. Entretanto, observam-se escassas pesquisas que visam esclarecer a composição da microbiota intestinal de crianças alérgicas, principalmente às proteínas do LV, na fase neonatal e em crianças com idade escolar (HILL e DRASAR, 1975).

A estabilidade na composição da microbiota intestinal também é significativamente afetada por outros fatores, dentre eles, a genética do hospedeiro, fatores ambientais, condições de higiene, resposta imunológica, utilização de antimicrobianos, exercícios físicos, e dieta. A dieta em particular tem um impacto marcante na diversidade microbiana, uma vez que esses microrganismos obtêm energia pelo metabolismo dos nutrientes alimentares (DE FILIPPO et al., 2010; COTTER et al., 2012; ALBENBERG e WU, 2014).

Em contraste, o impacto da mudança na dieta sobre a composição da comunidade microbiana ainda precisa ser mais bem avaliado. Há evidências de que a suplementação dietética com oligossacarídeos e inulina pode favorecer o crescimento de grupos específicos de bactérias, incluindo *Bifidobacterium* spp., assim como uma dieta sem LV e derivados pode contribuir para uma microbiota pobre em *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., e acarretar uma disbiose intestinal, alterando a função dessa população e podendo causar diversas patologias (BOUHNİK et al., 2004; KANAI et al., 2014; BACKED et al., 2015).

A microbiota intestinal residente auxilia na digestão de compostos não digeríveis pelas enzimas digestivas, além de fornecer importantes produtos de fermentação, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), produção de vitaminas K e B12, e atuam como fator de proteção contra microrganismos exógenos e patogênicos (QUI et al., 2010). Portanto, essa disbiose intestinal pode favorecer o estabelecimento de várias patologias, incluindo doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla, diabetes, alergias, asma, autismo, câncer de cólon e obesidade (PETERSEN e ROUND, 2014; VAN HUL et al., 2017; GOPALAKRISHNAN et al., 2018).

Considera-se que, a comunidade microbiana do intestino humano desempenha um papel crucial na saúde e nas doenças. Nas últimas décadas têm se notado elevado interesse na modulação microbiana pelo uso da dieta, assim como, o possível impacto que dieta de exclusão de algum alimento, como o LV, pode causar (VAN HUL et al., 2017).

### **2.2.1 Microbiota intestinal envolvida nos processos alérgicos alimentares**

A mucosa intestinal humana é a principal interface entre o sistema imunológico e o ambiente externo, e é onde estão aderidas milhares de bactérias coletivamente chamadas de microbiota intestinal residente. A microbiota intestinal estimula o desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro e faz com que exista um estado de modulação imunológica constante, visto que ao mesmo tempo em que o sistema imunológico está pronto para agir contra substâncias desconhecidas e bactérias patogênicas, também é capaz de manter-se tolerante em relação à microbiota residente (WINKLER et al., 2007; VAN DEN ELSEN et al., 2019).

O sistema imunológico impõe pressão seletiva sobre a microbiota intestinal por meio de mecanismos inatos e adaptativos, como os peptídeos antimicrobianos e imunoglobulina A (IgA) (PETERSON et al., 2007). A maturação da microbiota intestinal saudável no início da vida, permite o equilíbrio de Th2/Th1, favorecendo uma resposta celular Th1, enquanto a disbiose, altera a homeostase da relação hospedeiro-microbiota, favorecendo a resposta Th2, característica das respostas alérgicas. A presença de populações de células T induzidas pela dieta e bactérias, pode ser necessária para induzir tolerância completa aos antígenos alimentares (MAZMANIAN e LIU, 2005).

Pesquisas recentes também sugerem que, a disbiose na microbiota intestinal neonatal promove alterações na função epitelial intestinal e o estímulo de células T CD4+, disfunção associada a alergias. Também, a microbiota intestinal poderia ser considerada um alvo para a intervenção preventiva e terapêutica contra alergias alimentares, em busca de tolerância (TAMBURINI e SHEN, 2016; PLUNKETT e NAGLER, 2017).

A tolerância imune é o estado de falta de resposta do sistema imunológico a

substâncias que têm o potencial de induzir uma resposta imune, e pode ser alcançada por mecanismos como: tolerância central e tolerância periférica. Os mecanismos exatos envolvidos no desenvolvimento da tolerância imunológica não têm sido totalmente definidos, embora, recentes evidências sugerem que a microbiota intestinal e seus metabólitos (principalmente ácidos graxos de cadeia curta), juntamente com a exposição a fatores alimentares no início da vida, influenciam criticamente no estabelecimento da tolerância imune aos antígenos alimentares (KIM e HONG, 2016).

### 3. OBJETIVOS

#### **Geral:**

Analisar de forma comparativa a quantificação bacteriana da microbiota fecal de crianças com e sem alergia ao leite de vaca.

#### **Específicos:**

1. Isolar e identificar espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium* de material fecal em ambos os grupos de crianças;
2. Quantificar por PCR em tempo real a presença de bactérias pertencentes: aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*; as famílias *Bacteroidaceae* e *Enterobacteriaceae*; aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Parabacteroides*; e de espécies bacterianas: *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium* Cluster I, e do domínio *Archaea*; e
3. Avaliar a diversidade genética por AP-PCR de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* isolados de ambos os grupos de crianças.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Participantes**

Cinquenta crianças entre 7 meses e 10 anos de idade, sem distinção de gênero e raça foram selecionadas para este estudo. Elas foram agrupadas como segue:

- Grupo 1: 25 crianças com alergia às proteínas do leite de vaca (LV), e com dieta de exclusão do leite e derivados; e
- Grupo 2: 25 crianças saudáveis, não alérgicas às proteínas do LV e derivados.

Para os dois grupos de crianças analisados, foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: tratamento com antibiótico nos últimos três meses que precederam a coleta, não apresentaram diarreia ou outras manifestações clínicas gastrointestinais por pelo menos 30 dias antes da coleta e/ou outro tipo de alergia alimentar associada. No caso de crianças alérgicas e que passaram por escapes (ingestão acidental de LV e/ou derivados) foram também excluídas do estudo.

Os pais ou responsáveis pelas crianças foram informados sobre o estudo e convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (1072/CEP).

#### **4.1.2 Dados clínicos dos participantes**

Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários existentes no Setor de atendimento da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. As seguintes informações obtidas foram: dados epidemiológicos individuais e familiares; história clínica e dados laboratoriais (dosagem de cálcio, imunoglobulinas, IMUNOCAP e/ou Prick, teste para proteínas do leite).

#### **4.1.3 Critérios utilizados para o diagnóstico de alergia à proteína do leite de vaca (APLV)**

O diagnóstico foi realizado pela equipe da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Os critérios usados foram: história clínica sugestiva, teste ImmunoCap e/ou Prick, teste positivo para o leite e/ou frações nos casos IgE mediados, e teste de provocação duplo cego controlado para o leite, com exceção de pacientes com anafilaxia.

#### **4.2 Amostras fecais**

Foram coletadas amostras fecais frescas e não diarréicas de todas as 50 crianças avaliadas neste estudo. Das crianças com alergia ao LV, as fezes foram coletadas um dia antes ou no dia da consulta agendada no Instituto da Criança. Das crianças saudáveis não alérgicas ao LV, as fezes foram coletadas no dia do processamento laboratorial. Todas as amostras fecais evacuadas naturalmente foram coletadas em potes de plástico esterilizados, sem conservantes, e estocados em lugar fresco fora da geladeira, segundo indicações laboratoriais. Esses materiais clínicos fecais foram transportados ao Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do ICB-USP, onde as análises microbiológicas foram realizadas.

#### **4.3 Isolamento e identificação bacteriana**

As amostras fecais foram cultivadas em meios seletivos apropriados para cada gênero bacteriano estudado, e incubadas em condições de anaerobiose (90% N<sub>2</sub> /10% CO<sub>2</sub>), a 37 °C, durante 72 horas. Para o isolamento bacteriano, pequenas porções de fezes foram semeadas em ágar Rogosa (JACKSON et al., 2002) específico para o gênero *Lactobacillus*; em meio *Bifidobacterium* (BFM) (NEBRA et al., 1999) para o gênero *Bifidobacterium*; em ágar cicloserina cefoxitina frutose (CCFA) (FERREIRA et al., 2003) para o gênero *Clostridium*; e em ágar *Bacteroides fragilis*-bile-esculina (BBE) (LIVINGSTON et al., 1978) para os gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*.

Após o período de incubação, quatro colônias características de cada gênero foram aleatoriamente selecionadas, para realização dos testes presuntivos.

Inicialmente, de cada colônia foi realizada a coloração de Gram, e semeadas em ágar sangue visando a obtenção de cultura pura e posterior realização do teste respiratório. Posteriormente, a identificação definitiva em nível de gênero e espécie foi realizada por PCR, exceto para o gênero *Clostridium* onde os isolados foram identificados utilizando-se o kit comercial API-20A (bioMérieux®).

#### **4.4 Detecção molecular bacteriana**

##### **4.4.1. Extração do DNA bacteriano**

O DNA total bacteriano foi obtido de cada amostra fecal coletada, e posteriormente, de cada microrganismo isolado. As extrações dos respectivos DNA foram realizadas utilizando-se os kits comerciais: QIAmp DNA Stool Mini (Qiagen® - Alemanha) para extração do DNA total das fezes, e Easy DNA (Invitrogen do Brasil®) para extração de cada microrganismo isolado, seguindo as instruções dos fabricantes. Todas as amostras de DNA obtidas foram avaliadas quanto à concentração e integridade, por espectrofotometria (DeNovix DS-11 spectrophotometer, DeNovix®, EUA), e visualizado em gel de agarose (1%). Os DNA foram mantidos a -80 °C, até seu uso.

##### **4.4.2 Detecção qualitativa bacteriana por PCR**

Os DNA das colônias isoladas foram submetidos à amplificação por PCR convencional utilizando oligonucleotídeos específicos para gêneros ou espécies (Tabelas 2 e 3 ). Os oligonucleotídeos para detecção de algumas espécies de *Lactobacillus* foram desenhados utilizando-se os programas: Primer - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Cada reação de PCR teve como volume final 25 µL sendo constituída por água ultrapura, PCR buffer (10X), MgCl<sub>2</sub> (50 mM), dNTP (0,2 µM), cada iniciador (0,4 µM), Platinum Taq DNA polimerase (0,5 U) e DNA (1 ng). As reações de PCR para *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., e as de PCR multiplex para os gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®, Alemanha).

Todos os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados sob luz ultravioleta com o sistema fotográfico Kodak Photographer Science-150.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados na detecção de espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Microorganismos	Oligonucleotídeos 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referências
<i>Lactobacillus</i> spp.	F: AGC AGTAGGAATCTTCCA R: ATTYCACCGCTACACATG	60	341	Ponnusany et al. (2011)
<i>L. acidophilus</i>	F: CGCTTACGCTACCACTTTGC R: TCAAAGGAAACGAAGGAAAGG	58	515	Deste estudo
<i>L. casei</i>	F: CTCTGTGCGAGTCATCATCA R: CGTAAAGCACCAATCCCC	55	164	Deste estudo
<i>L. fermentum</i>	F: TTCACTGCTCAAGTAATCATCGG R: CCGCCTAAGGTGGGACAGA	60	636	Deste estudo
<i>L. rhamnosus</i>	F: GGAGTCGTCATCATCATC R: CGGGTCTTCAAGCAATACTC	54	330	Deste estudo
<i>Bifidobacterium</i> spp.	F: GGGTGGTAATGCCGGATG R: CCACCGTTACCCGGGAA	55	523	Matsuki et al. (2003)
<i>B. adolescentis</i>	F: ACCATTCCACGGTCTCCGT R: ATCCGAACTGAGACCGGTT	60	472	Youn et al. (2008)
<i>B. infantis</i>	F: CTTTTGCCTGGCGGATTC R: AACGATCGAAACGAACAATAGAGTT	60	178	Haarman e Knol (2005)
<i>B. bifidum</i>	F: ACCGACCTGCCCCATGC R: CCCATCCCACGCCGATAGA	61	108	Rinne et al. (2005)
<i>B. breve</i>	F: AATGCCGGATGCTCCATCACAC R: GCCTTGCTCCCTAACAAAAGAGG	62	285	Rinne et al. (2005)

F: Forward / R: Reverse

Base degenerada: Y: C/T

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados na detecção de espécies de *Bacteroides* e *Parabacteroides* por PCR-Multiplex.

Microrganismos	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Tm (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referências
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	F: GTACACACCGCCCGT	63,8	180	Liu et al. (2003)
	R: ACCTATGAAATCGTTGTTACG			
<i>B. vulgatus</i>	R: GGCTTCTTACTTTCTCTCTTCCG	250		
<i>B. fragilis</i>	R: GCTAATCCCCCAATCATA	420		
<i>B. caccae</i>	R: TCGTTTCCCATGCTGG	500		
<i>B. ovatus</i>	R: AATAATGCGTACTCGAACAC	610		
<i>B. eggerthii</i>	F: GTCATATTAACGGTGGCG	62,5	250	
<i>B. uniformis</i>	F: TCCGTTTTCCACTTATAAGA		350	
<i>B. stercoris</i>	F: CTACGACATAGTCTTGGTGAG		400	
<i>Parabacteroides distasonis</i>	R: GGGTTBCCCCATTCCG	57,0	220	
	F: TGATCCCTTGCTGCT			
<i>P. merdae</i>	R: ATCCCCCTCATTCCGGA	57,0	310	
	F: GAGGTATGTAGCTCTCTGGTA			
	R: TTTTACCCTTACGGAG			

F: Forward / R: Reverse;

#### 4.4.3 Quantificação bacteriana por PCR em Tempo Real (q-PCR)

A avaliação quantitativa foi realizada utilizando-se o sistema SYBR® Green, tendo como alvos os genes 16S rRNA dos seguintes microrganismos: *Archaea*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* Cluster I, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, e *Escherichia coli*. As sequências dos oligonucleotídeos e as condições de PCR encontram-se descritos na Tabela 4. As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 20 µL contendo: 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix (2X; GoTaq qPCR Master Mix - Promega Corporation, Brasil), 0,9 µL de cada iniciador (5 µM), 2 µL de DNA, e 7,1 µL de água ultrapura (Promega, Brasil).

As curvas-padrão foram realizadas para cada microrganismo avaliado,

utilizando-se oito pontos das diluições seriadas. As curvas foram realizadas com cepas de referência: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29742; *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482; *Clostridium difficile* VPI 10468; *Clostridium perfringens* ATCC 13124; *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1696, e *Methanobrevibacter smithii* ATCC 35061 (Figuras 3 a 13). Foram consideradas para as análises todas as curvas que apresentaram uma eficiência entre 0,8 e 1,0.

Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Mort lake, New South Wales, Austrália). As condições para as amplificações foram: 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, e temperatura de anelamento por 30 segundos. Após a ciclagem a curva de dissociação (“melting curve”) foi realizada para avaliar a presença de produtos inespecíficos (“primers dimers”). Como controle negativo foi utilizado uma mistura da reação de PCR sem DNA.

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos utilizados na detecção quantitativa bacteriana utilizando o sistema SYBR Green.

Microrganismos	Oligonucleotídeos 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referências
<i>Archaea</i>	F: TTMCCGCGGCKGCTGVCAC R: GYGCASCAGKCGMGAAW	62	143	Garcia et al. (2011)
<i>Firmicutes</i>	F: TRAACTYAAAGGAATTGACG R: ACCATGCACCACCTGTC	61	155	De Gregoris et al. (2011)
<i>Bacteroidetes</i>	F: TGGTAGTCCRCRCDGTAACGATG R: ATGTTCTCCGCTTGTGC	60	150	Deste estudo
<i>Bacteroidaceae</i>	F: GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT R: CGGAYGTAAGGGCCGTGC	68	140	Rintilla et al. (2004)
<i>Enterobacteriaceae</i>	F: SATTGACGTTACYGCAGAAGAAGC R: CTCTACRAGACTCAAGCYTGC	60	190	Frank et al. (2007)
<i>Clostridium</i> Cluster I	F: ATGCAAGTCGAGCGAKG R: TATGCGGTATTAATCTYCCTTT	60	120	Rintilla et al. (2004)
<i>Lactobacillus</i> spp.	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: ATTYCACCGCTACACATG	56	380	Ponnusamy et al. (2010)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	F: GCGTGCTTAACACATGCAAGTC R: CACCCGTTTCCAGGAGCTATT	60	125	Ponnusamy et al. (2010)
<i>Clostridium perfringens</i>	F: TCATCATTCAACCAAGGAGCAATCC R: CCTTGGTAGGCCGTTACCC	55	105	Siragusa et al. (2007)
<i>Clostridium difficile</i>	F: ATTAGGAGGAACACCAGTTG R: AGGAGATGTCATTGGGATGT	55	307	Kang et al. (2010)
<i>Escherichia coli</i>	F: AGAAGCTTGCTCTTTGCTGA R: CTTTGGTCTTGCAGCTTAT	57	120	Lee et al. (2010)

F: Forward / R: Reverse;

Bases degeneradas: K: G/T; V: A/C/G; Y: C/T; S: C/G; R: A/G; M: A/C; W: A/T.

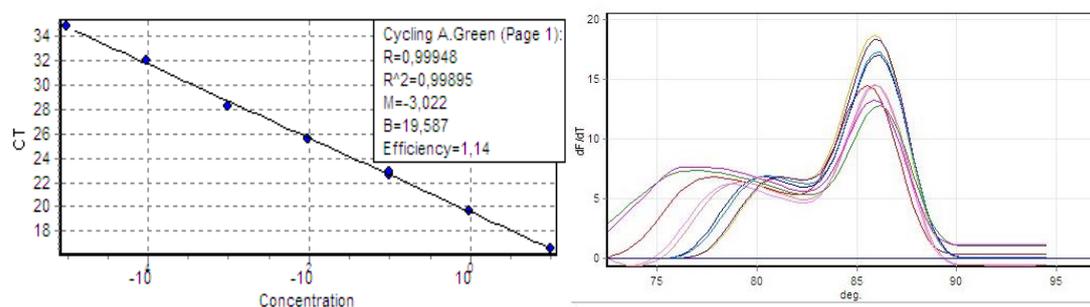


Figura 3. Curva padrão construída com a cepa de referência *E. coli* ATCC 25922.

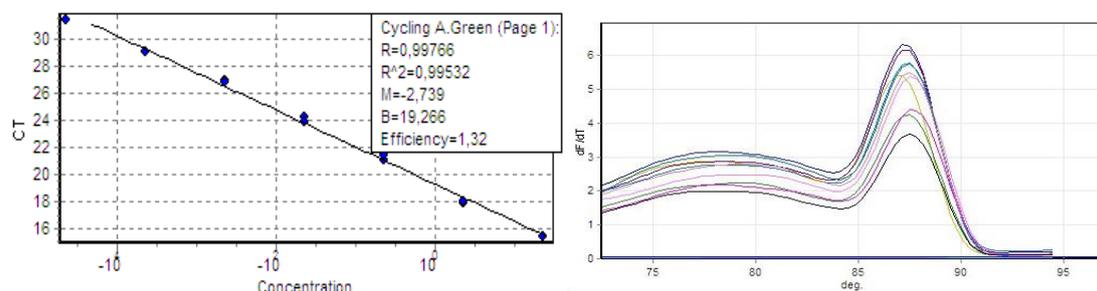


Figura 4. Curva padrão para *Bacteroidetes* construída com *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29742.

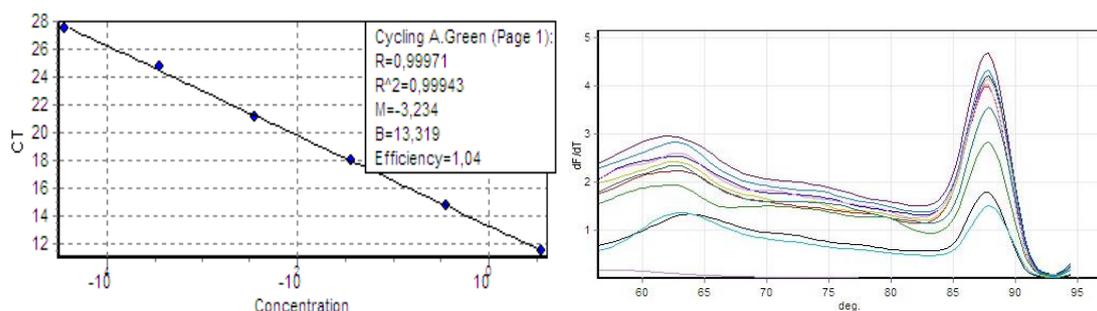


Figura 5. Curva padrão para *Lactobacillus* spp. construída com *L. acidophilus* ATCC 4356.

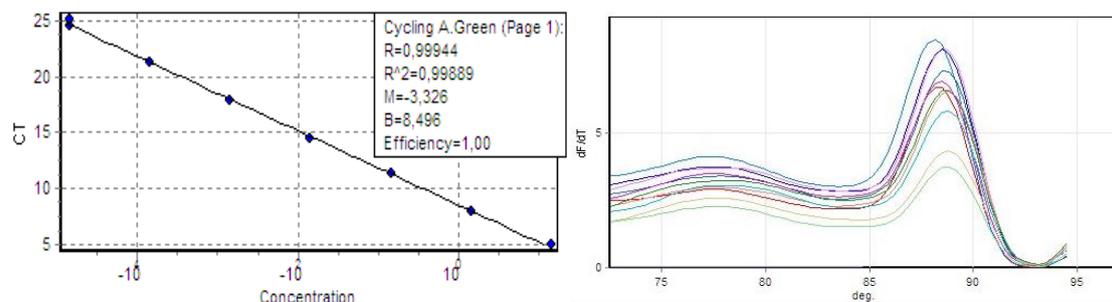


Figura 6. Curva padrão para *Clostridium difficile* realizada com *C. difficile* VPI 10468.

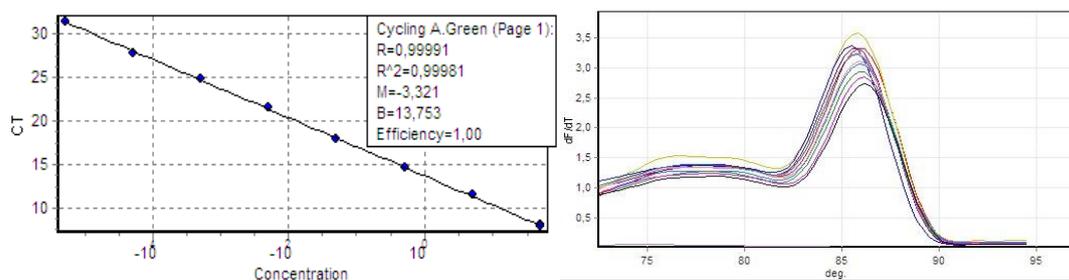


Figura 7. Curva padrão para *Bacteroidaceae* construída com *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482.

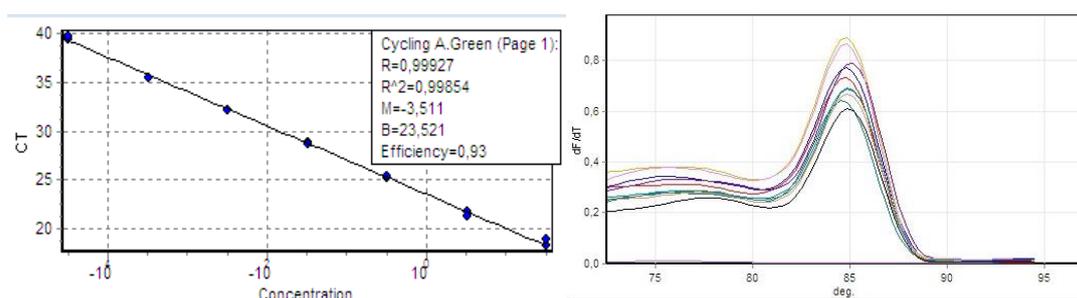


Figura 8. Curva padrão construída com *C. perfringens* ATCC 13124.

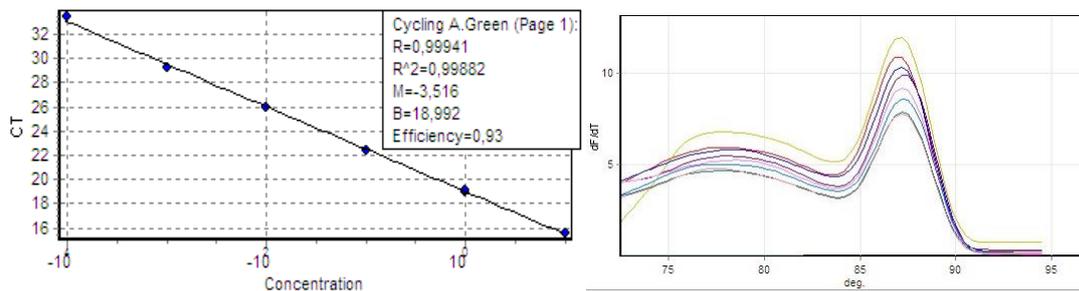


Figura 9. Curva padrão construída com *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1696.

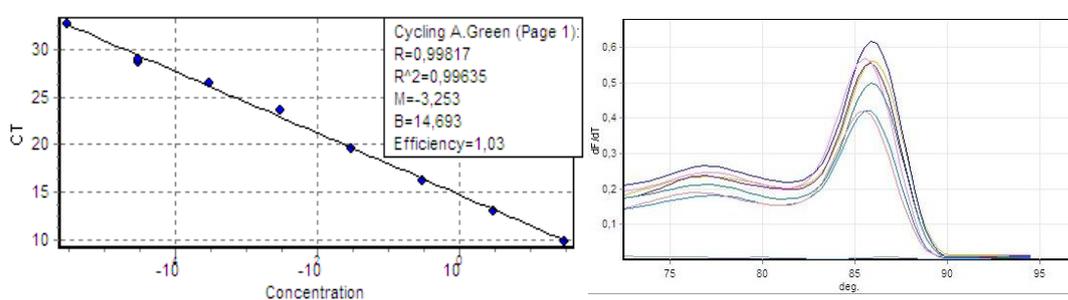


Figura 10. Curva padrão construída com *C. difficile* VPI 10468.

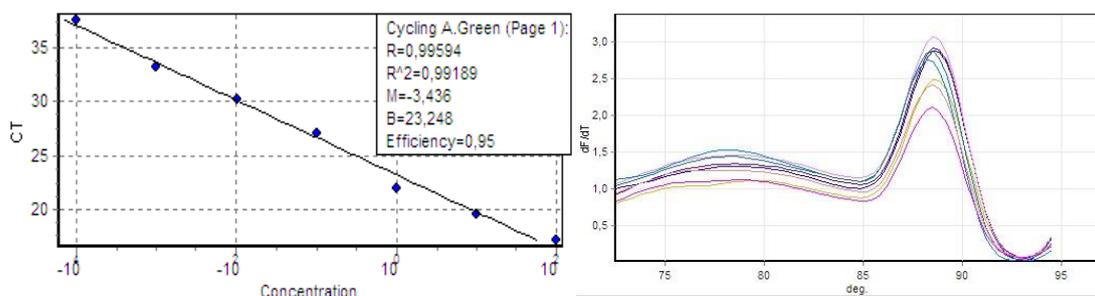


Figura 11. Curva padrão para *Enterobacteriaceae* realizada com *E. coli* ATCC 25922.

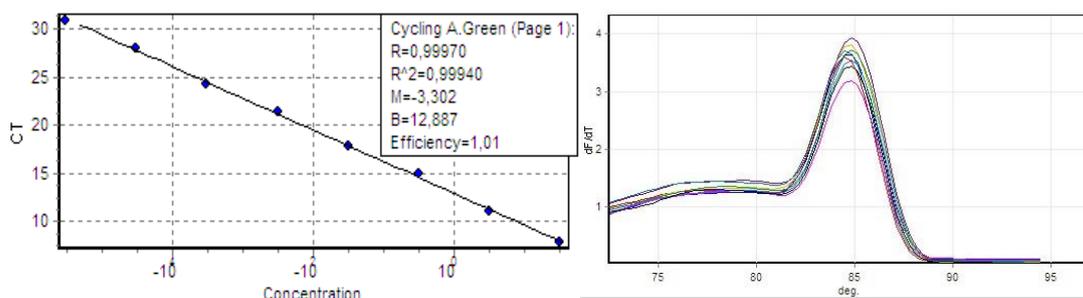


Figura 12. Curva padrão para *Firmicutes* realizada com *C. perfringens* ATCC 13124.

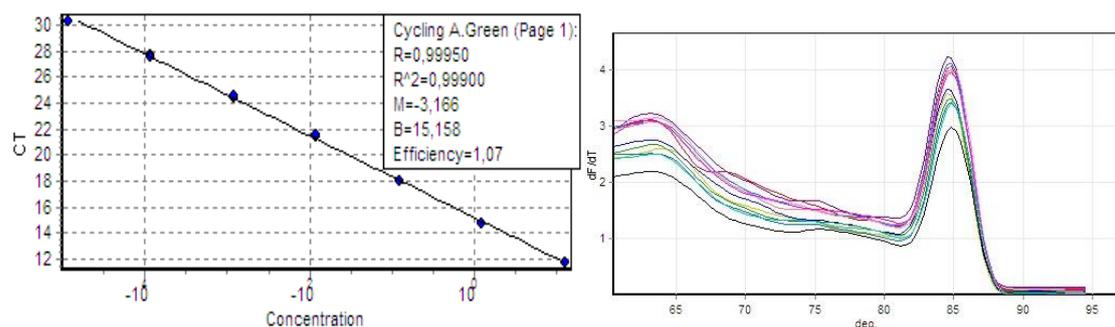


Figura 13. Curva padrão para *Archaea* realizada com *M. smithii* ATCC 35061.

#### 4.5 Tipagem Molecular

A diversidade genética das espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* isolados de ambos os grupos de crianças foi avaliada pela técnica de AP-PCR, utilizando-se o oligonucleotídeo arbitrário OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3') (CHEN et al., 1994).

As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25  $\mu$ L, contendo: PCR buffer (10X),  $MgCl_2$  (1,5 mM), dNTP (0,2  $\mu$ M), Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen do Brasil) (0,5 U), iniciador (0,4  $\mu$ M) e DNA (1 ng). Os produtos das amplificações foram observados por eletroforese em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados sob luz

ultravioleta. Foram utilizados marcadores de peso molecular de 100 bp e 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen Brasil).

Os perfis genéticos foram analisados e utilizados para a construção dos dendrogramas com auxílio do programa NTSYS (Applied Biostatitics, Inc. versão 2.21), utilizando os coeficientes de SM (Simple Matching) e UNI1. As cepas de referência *Bifidobacterium infantis* ATCC 35624, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 foram incluídas nas análises.

#### **4.6 Análises Estatísticas**

Os dados obtidos foram analisados aplicando-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e o paramétrico Mann-Whitney, utilizando nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os dados nominais foram analisados utilizando-se o teste de Chi-quadrado. As análises foram obtidas com o programa estatístico BioStat 2009 versão 5.3.5.

## 5. RESULTADOS

Os dados demográficos e as características clínicas das crianças alérgicas e não alérgicas são mostradas na Tabela 5; também, podem ser observadas informações sobre tipo de parto, aleitamento materno até os seis meses de vida, reposição de cálcio, e alergia mediada ou não por IgE. As crianças alérgicas incluídas no estudo não fizeram uso de substitutos do leite, como por exemplo, fórmulas hidrolisadas, apenas ingeriam eventualmente suco de soja; igualmente, as crianças não alérgicas também ingeriam leite de vaca e artificial, e eventualmente, suco de soja.

### 5.1 Isolamento e identificação

Em todas as Tabelas apresentadas, as amostras obtidas de crianças alérgicas que fizeram reposição de cálcio estão sombreadas em azul. Nos grupos de crianças alérgicas e não alérgicas, das 25 amostras fecais, respectivamente, 14 (56%) e 20 (80%) amostras foram positivas para espécies de *Lactobacillus* (Tabela 6). As espécies mais isoladas em ambos os grupos de crianças foram *L. rhamnosus* e *L. casei*. Para o gênero *Bifidobacterium*, 19 (76%) amostras de crianças alérgicas e 23 (92%) das não alérgicas foram positivas, sendo as espécies mais isoladas *B. infantis* e *B. breve* (Tabela 7).

**Tabela 5.** Dados demográficos e características clínicas das 25 crianças alérgicas e 25 não alérgicas ao leite de vaca.

Dados	Crianças	
	Alérgicas (25)	Não Alérgicas (25)
<b>Idade</b> (Média em anos)	6	5
<b>Gênero:</b>		
Masculino	18	12
Feminino	7	13
<b>Tipo de Parto:</b>		
Normal	5	18
Cesárea	18	7
Normal com Fórceps	1	0
<b>Reposição de Cálcio</b>		
Sim	15	0
Não	10	25
<b>Aleitamento materno</b> (exclusivo até 6 meses)		
Sim	3	25
Não	22	0
<b>Alergia mediada por IgE</b>		
Sim	24	N/A
Não	1	N/A

N/A: Não se aplica

**Tabela 6.** Distribuição de espécies do gênero *Lactobacillus* identificadas nas amostras fecais de crianças alérgicas (25) e não alérgicas (25).

Nº. da amostra fecal	Espécies de <i>Lactobacillus</i> (Nº. de isolados)	
	Crianças alérgicas (14)	Crianças não alérgicas (20)
1	-----	<i>L.casei</i> (4)
2	<i>L. rhamnosus</i> (2)	-----
3	<i>L. casei</i> (4)	<i>Lactobacillus</i> spp.(4)
4	-----	<i>L. rhamnosus</i> (2)
5	-----	<i>L. casei</i> (3), <i>Lactobacillus</i> spp. (1)
6	-----	<i>L. casei</i> (4)
7	-----	-----
8	<i>L. rhamnosus</i> (4)	<i>L. rhamnosus</i> (4)
9	<i>L. casei</i> (4)	<i>L. rhamnosus</i> (3), <i>L. casei</i> (1)
10	<i>L. rhamnosus</i> (4)	<i>L. rhamnosus</i> (3), <i>Lactobacillus</i> sp. (1)
11	<i>Lactobacillus</i> spp. (2)	-----
12	-----	-----
13**	-----	<i>Lactobacillus</i> sp. (4)
14	<i>L. casei</i> (1), <i>Lactobacillus</i> sp. (2)	<i>Lactobacillus</i> sp.(4)
15	<i>L.casei</i> (1)	<i>L. rhamnosus</i> (4)
16**	<i>Lactobacillus</i> spp. (4)	<i>L. rhamnosus</i> (4)
17*	-----	<i>L. rhamnosus</i> (4)
18**	<i>Lactobacillus</i> spp. (4)	<i>L. rhamnosus</i> (4)
19	<i>L. rhamnosus</i> (2)	<i>L. rhamnosus</i> (4)
20	<i>L. rhamnosus</i> (4)	<i>L. casei</i> (4)
21	-----	<i>Lactobacillus</i> sp. (2)
22	<i>Lactobacillus</i> spp. (3)	-----
23	<i>L. rhamnosus</i> (4)	<i>L. rhamnosus</i> (4)
24	-----	<i>L. rhamnosus</i> (4)
25	-----	<i>L. rhamnosus</i> (4)
Total de isolados	45	76

Sombreadas em azul, estão representadas as crianças alérgicas que fizeram reposição de cálcio;

\*Criança alérgica com alergia não mediada por IgE;

\*\*Criança alérgica que teve aleitamento materno;

-----: Amostra negativa para este gênero.

**Tabela 7.** Distribuição de espécies dos gêneros *Bifidobacterium* identificadas nas amostras fecais de 25 crianças alérgicas e 25 não alérgicas.

Nº. da amostra fecal	Espécies de <i>Bifidobacterium</i> (Nº. de isolados)	
	Crianças alérgicas (19)	Crianças não alérgicas (23)
1	-----	<i>B. infantis</i> (1)
2	<i>B. infantis</i> (1)	-----
3	-----	<i>Bifidobacterium</i> sp. (3), <i>B. infantis</i> (1)
4	<i>B. infantis</i> (1), <i>Bifidobacterium</i> spp. (3)	<i>Bifidobacterium</i> spp. (1)
5	-----	<i>B. infantis</i> (4)
6	-----	<i>B. infantis</i> (4)
7	<i>B. infantis</i> (4)	-----
8	<i>B. infantis</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
9	<i>B. infantis</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
10	-----	<i>B. breve</i> (1)
11	<i>Bifidobacterium</i> spp.(2)	<i>B. infantis</i> (4)
12	<i>B. infantis</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
13**	<i>B. infantis</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
14	<i>B. infantis</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
15	<i>B. infantis</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
16**	<i>B. infantis</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
17*	<i>B. infantis</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
18**	<i>B. breve</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
19	<i>B. breve</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
20	-----	<i>B. infantis</i> (4)
21	<i>Bifidobacterium</i> spp. (4)	<i>B. infantis</i> (4)
22	<i>Bifidobacterium</i> spp. (4)	<i>B. infantis</i> (4)
23	<i>B. infantis</i> (4)	<i>B. infantis</i> (4)
24	<i>B. infantis</i> (4)	<i>Bifidobacterium</i> spp. (4)
25	<i>Bifidobacterium</i> spp. (4)	<i>B. infantis</i> (4)
<b>Total de isolados</b>	<b>71</b>	<b>83</b>

Sombreadas em azul, estão representadas as crianças alérgicas que fizeram reposição de cálcio;

\*Criança alérgica com alergia não mediada por IgE;

\*\*Criança alérgica que teve aleitamento materno;

-----: Amostra negativa para este gênero.

Na Tabela 8 podem ser observados os valores numéricos de isolamento do gênero *Clostridium*, sendo 15 (60%) de crianças alérgicas e 9 (36%) de não alérgicas. Este gênero foi observado em menor número de amostras e de isolados, porém com maior diversidade de espécies. Na Tabela 9 se observa que 24 (96%) amostras fecais de alérgicos foram positivas para *Bacteroides* e/ou para o gênero *Parabacteroides*. Já nas de crianças não alérgicas 22 (88%) amostras foram positivas para *Bacteroides* e/ou *Parabacteroides*.

**Tabela 8.** Distribuição de espécies do gênero *Clostridium* identificadas nas 25 amostras fecais de crianças alérgicas e não alérgicas.

Nº. da amostra fecal	Espécies de <i>Clostridium</i> (Nº. de isolados)	
	Crianças alérgicas (15)	Crianças não alérgicas (9)
1	-----	-----
2	-----	-----
3	-----	<i>C. innocuum</i> (2)
4	<i>C. septicum</i> (2)	<i>C. septicum</i> (2)
5	<i>Clostridium</i> spp. (4)	-----
6	<i>C. difficile</i> (2); <i>C. septicum</i> (1)	<i>C. septicum</i> (1), <i>Clostridium</i> sp.(3)
7	<i>C. butyricum</i> (4)	<i>C. clostridioforme</i> (1), <i>C. sordellii</i> (1)
8	-----	-----
9	-----	-----
10	-----	-----
11	-----	-----
12	<i>C. innocuum</i> (4)	-----
13**	<i>C. paraputrificum</i> (4)	<i>C. septicum</i> (4)
14	<i>C. septicum</i> (4)	-----
15	<i>C. septicum</i> (4)	<i>C. butyricum</i> (4)
16**	<i>C. innocuum</i> (2), <i>C. baratii</i> (1)	<i>Clostridium</i> sp. (4)
17*	<i>C. butyricum</i> (1), <i>C. innocuum</i> (2)	<i>Clostridium</i> sp. (2)
18**	<i>C. innocuum</i> (4)	-----
19	-----	-----
20	<i>C. baratii</i> (1), <i>C. butyricum</i> (3)	<i>C. innocuum</i> (4)
21	<i>C. butyricum</i> (3), <i>C. perfringens</i> (1)	-----
22	<i>C. perfringens</i> (4)	-----
23	-----	-----
24	-----	-----
25	<i>Clostridium</i> spp. (4)	-----
Total de isolados	55	28

Sombreadas em azul, estão representadas as crianças alérgicas que fizeram reposição de cálcio;

\*Criança alérgica com alergia não mediada por IgE ;

\*\*Criança alérgica que teve aleitamento materno;

-----: Amostra negativa para este gênero.

**Tabela 9.** Distribuição de espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* identificadas nas amostras fecais de 25 crianças alérgicas e 25 não alérgicas.

Nº. da amostra fecal	Espécies de <i>Bacteroides</i> e <i>Parabacteroides</i> (Nº. de isolados)	
	Crianças alérgicas (24)	Crianças não alérgicas (22)
1	<i>B. vulgatus</i> (4)	<i>B. vulgatus</i> (3), <i>B. fragilis</i> (1)
2	<i>B. vulgatus</i> (1), <i>P. distasonis</i> (3)	<i>P. distasonis</i> (4)
3	<i>P. distasonis</i> (4)	<i>B. vulgatus</i> (4)
4	<i>B. fragilis</i> (4)	<i>P. distasonis</i> (3), <i>B. vulgatus</i> (1)
5	<i>P. distasonis</i> (4)	<i>B. vulgatus</i> (2), <i>P. distasonis</i> (2)
6	<i>B. vulgatus</i> (3), <i>P. distasonis</i> (1)	<i>B. vulgatus</i> (3), <i>B. merdae</i> (1)
7	<i>P. distasonis</i> (2)	<i>B. ovatus</i> (1), <i>B. vulgatus</i> (2)
8	<i>B. fragilis</i> (1), <i>B. vulgatus</i> (1)	-----
9	<i>B. fragilis</i> (4)	<i>P. distasonis</i> (3), <i>B. fragilis</i> (1)
10	<i>B. vulgatus</i> (1), <i>P. distasonis</i> (1)	<i>P. distasonis</i> (4)
11	<i>B. thetaiotaomicron</i> (1), <i>P. distasonis</i> (2)	<i>B. fragilis</i> (4)
12	-----	<i>B. fragilis</i> (3)
13**	<i>B. vulgatus</i> (1)	-----
14	<i>P. distasonis</i> (2), <i>B. vulgatus</i> (2)	-----
15	<i>B. vulgatus</i> (4)	<i>B. vulgatus</i> (3)
16**	<i>B. uniformis</i> (1), <i>P. distasonis</i> (2), <i>B. eggerthii</i> (1)	<i>B. thetaiotaomicron</i> (4)
17*	<i>P. distasonis</i> (4)	<i>B. fragilis</i> (4)
18**	<i>B. vulgatus</i> (4)	<i>B. vulgatus</i> (2), <i>B. fragilis</i> (2)
19	<i>B. distasonis</i> (2), <i>B. vulgatus</i> (2)	<i>B. thetaiotaomicron</i> (3), <i>P. distasonis</i> (1)
20	<i>B. caccae</i> (2) <i>B. ovatus</i> (1), <i>P. distasonis</i> (1)	<i>B. vulgatus</i> (1)
21	<i>B. vulgatus</i> (2)	<i>P. distasonis</i> (1)
22	<i>P. distasonis</i> (4)	<i>B. fragilis</i> (3)
23	<i>B. ovatus</i> (4)	<i>P. distasonis</i> (4)
24	<i>B. ovatus</i> (4)	<i>B. vulgatus</i> (4)
25	<i>B. ovatus</i> (4)	<i>B. vulgatus</i> (4)
<b>Total de isolados</b>	<b>84</b>	<b>78</b>

Sombreadas em azul, estão representadas as crianças alérgicas que fizeram reposição de cálcio;

\*Criança alérgica com alergia não mediada por IgE;

\*\*Criança alérgica que teve aleitamento materno;

-----: Amostra negativa para este gênero.

Na Tabela 10, observa-se o número de espécies bacterianas isoladas em crianças alérgicas e não alérgicas, de acordo com a faixa etária. No grupo etário de 0 a 12 meses de idade, se observou uma baixa diversidade bacteriana em ambos os grupos de crianças avaliadas. Na mesma Tabela 10 é observada que crianças de >1 ano de idade até a idade limite (10 anos) mostraram maior distribuição bacteriana, ou seja, maior número de isolados nos dois grupos de crianças. Em crianças de ambos os grupos, na faixa etária de 6 a 10 anos, se observam as presenças de *Lactobacillus* spp., *L. rhamnosus*, *L. casei*, *Bifidobacterium* spp., *B. infantis*, *P. distasonis*, *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *C. innocuum* e *C. septicum*.

**Tabela 10.** Número de amostras fecais positivas e de espécies isoladas de acordo com a faixa etária em crianças alérgicas e não alérgicas.

Espécies	Amostras positivas/ Número de isolados					
	Alérgicas			Não Alérgicas		
	0-12m	13m- 5a	6-10a	0-12m	13m- 5a	6-10a
<i>Lactobacillus</i> spp.	0	1/4	4/11	1/4	1/4	2/6
<i>L. rhamnosus</i>	0	3/10	3/10	1/4	5/20	7/22
<i>L. casei</i>	0	2/6	1/4	1/4	2/8	1/4
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0	1/4	4/14	0	1/4	4/13
<i>B. infantis</i>	1/4	3/8	9/33	3/12	8/32	5/20
<i>B. breve</i>	0	2/4	0	0	1/1	0
<i>B. vulgatus</i>	1/1	6/12	4/13	1/2	4/9	4/15
<i>P. distasonis</i>	0	5/16	6/12	2/7	4/16	2/6
<i>B. fragilis</i>	0	0	3/10	1/1	1/4	3/9
<i>B. thetaiotaomicron</i>	0	0	1/1	0	0	2/7
<i>B. caccae</i>	0	1/2	0	0	0	0
<i>B. ovatus</i>	0	1/2	3/12	0	1/1	0
<i>Clostridium</i> spp.	0	1/1	0	0	1/3	2/6
<i>C. innocuum</i>	0	2/10	1/4	0	1/4	2/2
<i>C. septicum</i>	0	2/6	2/6	0	2/5	1/2
<i>C. difficile</i>	0	1/2	0	0	0	0
<i>C. clostridioforme</i>	0	0	0	0	1/1	0
<i>C. sordellii</i>	0	0	0	0	0	1/1
<i>C. butyricum</i>	0	1/1	1/4	0	1/4	0
<i>C. paraputrificum</i>	1/4	0	0	0	0	0
<i>C. perfringens</i>	0	0	1/4	0	0	0
<i>C. baratii</i>	0	0	1/2	0	0	0

m: meses/ a: anos

em destaque as espécies mais prevalentes entre os gêneros avaliados em ambos os grupos de estudo.

## 5.2 Análise bacteriana quantitativa por qPCR das amostras fecais

A análise quantitativa dos microrganismos realizada a partir das fezes de ambos os grupos de crianças é verificada na Tabela 11. As amostras das crianças não alérgicas quando comparadas com o grupo das crianças alérgicas apresentaram diferenças estatisticamente significativas para *Clostridium perfringens* ( $p = 0,037$ ), *Clostridium* Cluster I ( $p = 0,005$ ), *Bacteroidetes* ( $p = 0,051$ ), e *Escherichia coli* ( $p = 0,001$ ).

**Tabela 11.** Determinação quantitativa bacteriana nas amostras fecais das crianças alérgicas e não alérgicas. Valores expressos em mediana.

Microrganismos analisados	Nº. de cópias por g/fezes		Valor de $p$
	Alérgicas (n = 25)	Não alérgicas (n = 25)	
<i>Archaea</i>	1,59 x 10 (4)	6,89 x 10 <sup>1</sup> (10)	0,095
<i>Firmicutes</i>	7,93 x 10 <sup>3</sup> (25)	1,03 x 10 <sup>4</sup> (25)	0,808
<b><i>Bacteroidetes</i></b>	<b>5,56 x 10<sup>7</sup> (25)</b>	<b>5,45 x 10<sup>8</sup> (25)</b>	<b>0,051</b>
<i>Bacteroidaceae</i>	3,95 x 10 <sup>4</sup> (25)	1,54 x 10 <sup>4</sup> (25)	0,197
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,42 x 10 <sup>3</sup> (25)	2,00 x 10 <sup>2</sup> (25)	0,299
<b><i>Clostridium</i> Cluster I</b>	<b>0 (2)</b>	<b>2,90 x 10<sup>-2</sup> (4)</b>	<b>0,005</b>
<i>Lactobacillus</i> spp.	5,45 x 10 (16)	5,00 x 10 (21)	0,193
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1,59 x 10 (19)	2,38 x 10 <sup>2</sup> (18)	0,341
<b><i>Clostridium perfringens</i></b>	<b>1,78 x 10<sup>2</sup> (25)</b>	<b>9,14 x 10 (25)</b>	<b>0,037</b>
<i>Clostridium difficile</i>	3,48 x 10 <sup>-3</sup> (4)	4,64 x 10 <sup>-3</sup> (1)	0,846
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b>5,01 x 10 (22)</b>	<b>1,42 x 10<sup>3</sup> (22)</b>	<b>0,001</b>

Nível de significância do teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Em destaque os valores de  $p$  com significância estatística.

Em parênteses o número de amostras positivas.

### 5.3 Diversidade genética

Na análise da diversidade genética utilizada para as espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, o oligonucleotídeo OPA-03 revelou bandas nítidas que possibilitaram a construção de dendrogramas para os isolados de ambos os grupos de crianças, por este motivo este oligonucleotídeo arbitrário foi escolhido para as análises.

Na Figura 14 pode-se observar o dendrograma formado com as 45 cepas de *Lactobacillus* obtidas de crianças alérgicas. Houve a formação de 15 clusters com 90% de similaridade, incluindo as três cepas de referência utilizadas (*E. coli* ATCC 25922, *C. perfringens* ATCC 13124, *L. acidophilus* ATCC 4356). O cluster I agrupou oito espécies de *Lactobacillus* em 2 subgrupos (A e B), somente o subgrupo B conteve duas espécies que formaram um clone (A16b/A16d).

No cluster II A, foram reunidas seis espécies isoladas de *Lactobacillus*, observando-se dois clones (A3d/A9d e A8a/A8b), sendo A3d e A9d de duas cepas de *L. casei* isoladas de crianças alérgicas distintas, ambas em dieta de exclusão da proteína do leite de vaca e realizando tratamento/acompanhamento no mesmo local, e A8a e A8b, que são cepas de *L. rhamnosus* da mesma criança alérgica. A cepa de referência *L. acidophilus* ATCC 4356 (LA) se agrupou nas cepas estudadas, mas em um subgrupo distinto, II B.

Os clusters III, IV, V, e VI formaram dois subgrupos cada um, sem a presença de clones. O cluster VII B agrupou o clone A15a/ A15b, o cluster VIII B o clone A20a/ A20b, IX B o clone A18c/A18d, e XA, o clone A24b/A24c. O cluster XIII formou o clone (A22a/A22b/A22c).

As cepas de referência *C. perfringens* ATCC 13124 (CP) e *E. coli* ATCC 25922 (EC) formaram, respectivamente, os clusters XIII e XV, e a cepa A3a (cluster XIV) é um isolado de *L. casei* que curiosamente formou o cluster isolado, diferentemente das outras cepas da mesma amostra e espécie que formaram um clone.

Na Figura 15 observa-se o dendrograma formado com as 76 espécies de *Lactobacillus* isoladas de crianças não alérgicas, formando de 15 grupos genéticos com 86% de similaridade. O cluster I foi formado por 16 isolados de *Lactobacillus*. O subgrupo I A, formado por 11 espécies com dois clones (NA14b/NA14c) *L.*

*rhamnosus* isolado da mesma amostra fecal e (NA8d/NA10a) *Lactobacillus* spp. isolados de crianças diferentes.

O cluster III B apresentou dois isolados distintos e um clone (NA16a/NA16b/NA16c) *L. rhamnosus*. O grupo IV foi formado por 10 espécies de *Lactobacillus*, sendo que o cluster IV B conteve duas espécies que formaram um clone (NA18b/NA18d) *L. rhamnosus*.

O cluster V foi formado por seis espécies, sendo que o subgrupo V A agrupou o clone (NA17a/NA17b/NA17c) *L. rhamnosus*. Já o cluster VI agrupou oito espécies, sendo que no subgrupo VI B foi observado o clone formado pelos isolados NA20b e NA20c (*L. casei*). No cluster VII A, dois isolados (NA13a/NA13b) formaram um clone e no subgrupo VII B também foi observado o clone formado por quatro cepas isoladas da mesma amostra (NA24a/NA24b/NA24c/NA24d).

O cluster IX B agrupou o clone (NA25b/NA25c) enquanto que, o cluster X B apresentou outro clone (NA15a/NA15b/NA15c) e o cluster XI A agrupou o clone NA23b/NA23c. As cepas de referência *C. perfringens* ATCC 13124 (CP), *L. acidophilus* ATCC 4356 (LA) e *E. coli* ATCC 25922 (EC), formaram clusters independentes, VIII, XII e XV, respectivamente.

A Figura 16 mostra o dendrograma formado pelas 71 cepas de *Bifidobacterium*, isolados de amostras fecais de crianças não alérgicas, o qual foi constituído por três clusters com 85% de similaridade. O grande cluster I foi formado por 59 isolados de *Bifidobacterium*, sendo que, no subgrupo I A foram observados oito clones distintos, onde todos foram formados por isolados da mesma amostra. A cepa de referência *Bifidobacterium infantis* ATCC 35624 (BI), agrupou-se neste grupo, porém, mais separada dos outros isolados. O subgrupo I B agrupou 17 isolados, com formação de três clones, além da cepa *C. perfringens* ATCC 13124 (CP).

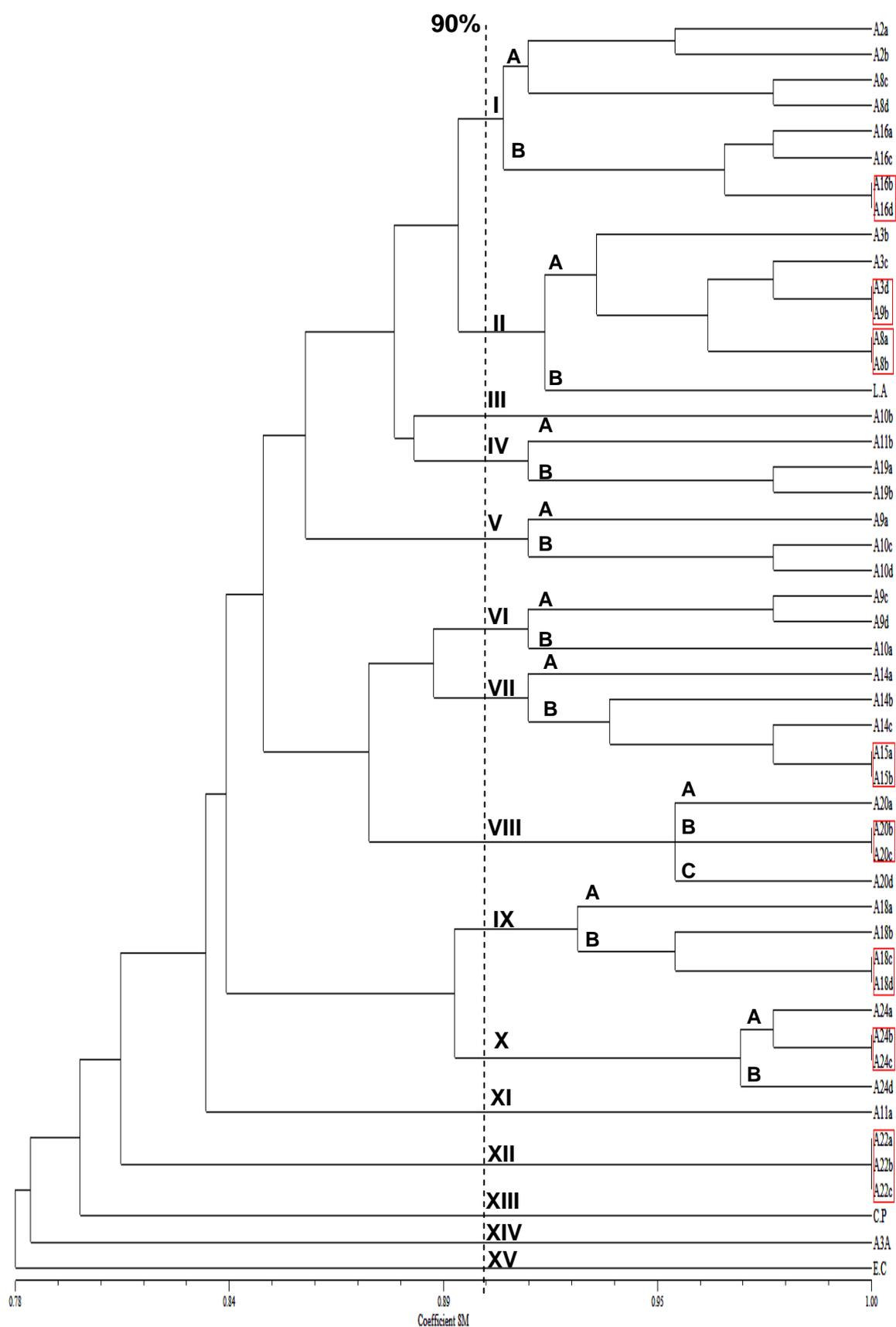
No cluster II foram reunidos 8 isolados, sendo que o subgrupo II A, apresentou um clone (A9c/A9b) e o subgrupo II B foi formado por uma única cepa de *B. infantis*. O cluster III foi formado por quatro isolados no subgrupo III A e o subgrupo III B foi formado somente pela cepa de referência *E. coli* ATCC 25922 (EC).

Na Figura 17, observa-se dendrograma formado pelas 83 espécies de *Bifidobacterium* isoladas de crianças não alérgicas formando 4 clusters genéticos com 87% de similaridade.

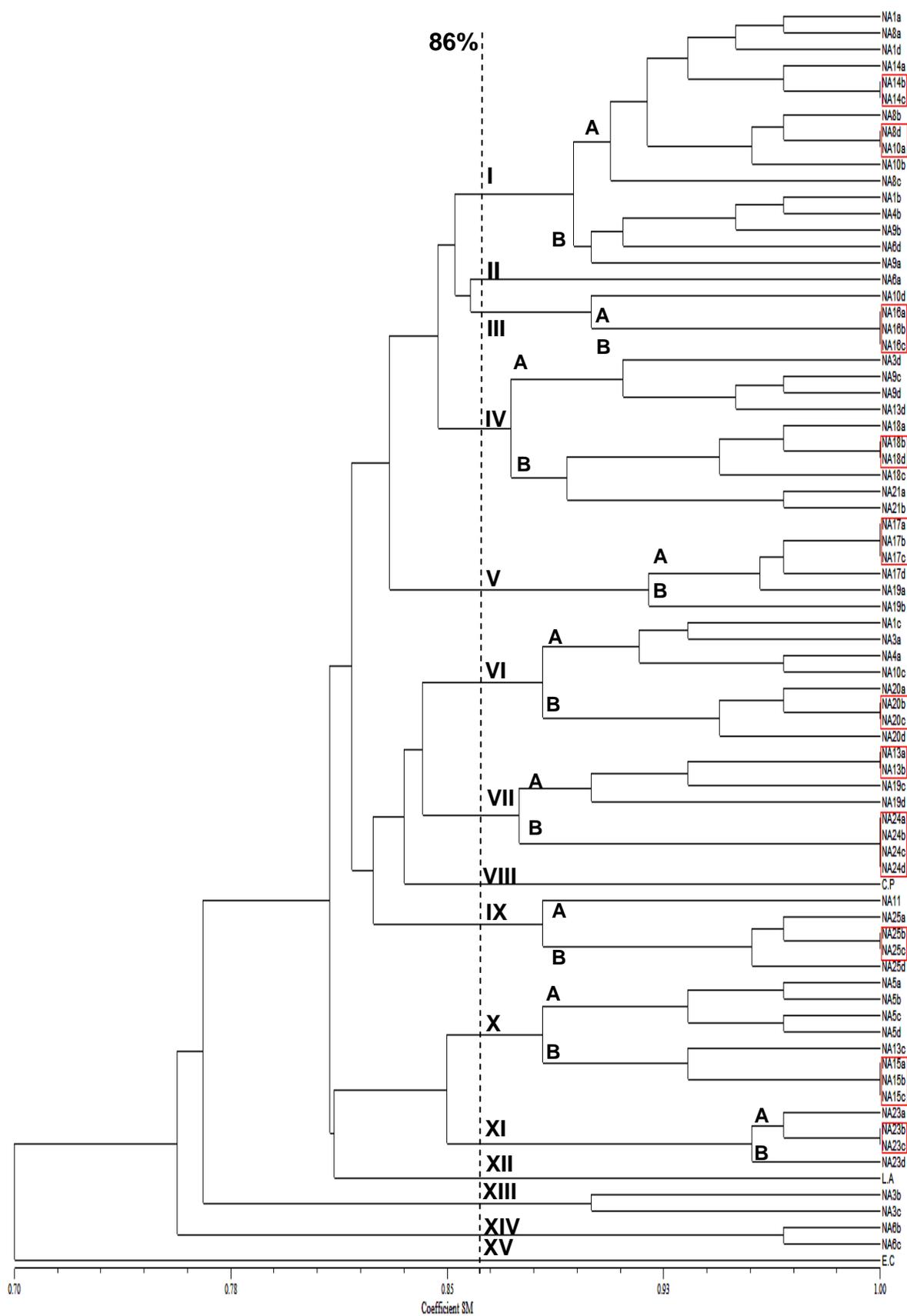
O cluster I foi composto por 11 isolados, com o subgrupo I A contendo dois clones (NA6a/NA6b) e (NA20c/NA20d) o subgrupo I B com quatro isolados da

mesma amostra e a formação de um clone com 3 destas cepas (NA18b/NA18c/NA18d). O cluster II apresentou 16 isolados, o subgrupo II A foi constituído por um clone (NA3a/NA3b/NA3c/NA3d) e o subgrupo II B com três clones. O grande cluster III foi formado por 57 isolados, o subgrupo III A com apenas 3 isolados e o restante dos isolados formando o subgrupo III B, onde se observa a formação de 14 clones e também a presença da cepa de referência *B. infantis* ATCC 35624 (BI).

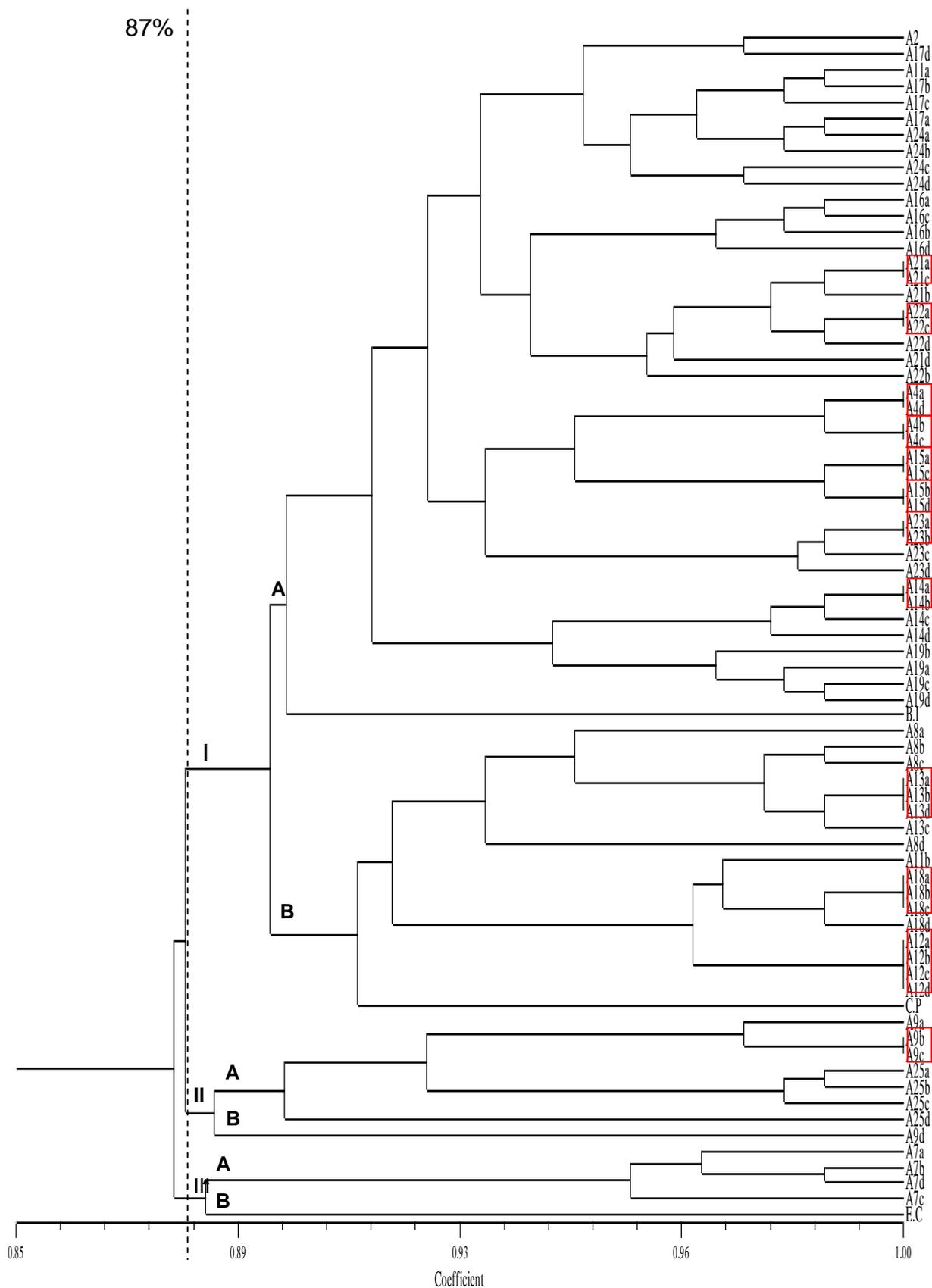
No cluster IV, as cepas de referência *C. perfringens* ATCC 13124 (CP) e *E. coli* ATCC 25922 (EC) formaram os subgrupos A e B respectivamente.



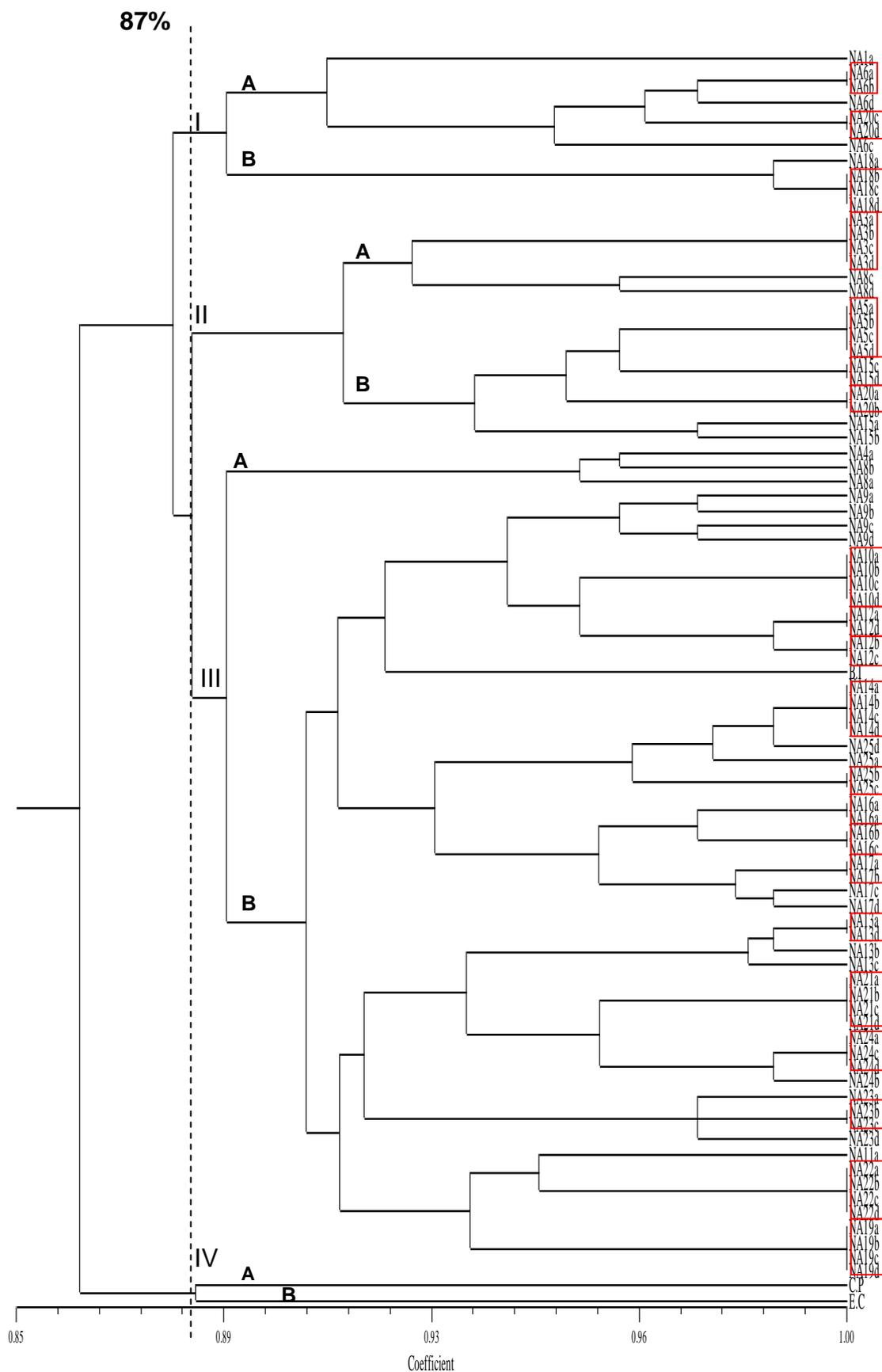
**Figura 14.** Dendrograma construído com as 45 espécies de *Lactobacillus* isoladas das amostras fecais de crianças alérgicas. Coeficiente de Simple Matching (SM). EC – *Escherichia coli* ATCC 25922, C.P- *Clostridium perfringens* ATCC 13124, LA- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.



**Figura 15.** Dendrograma construído com as 76 espécies de *Lactobacillus* isoladas das amostras fecais de crianças não alérgicas. Coeficiente de Simple Matching (SM). EC – *Escherichia coli* ATCC 25922, C.P- *Clostridium perfringens* ATCC 13124, LA- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356



**Figura 16.** Dendrograma construído com 71 isolados de *Bifidobacterium* isoladas das amostras fecais de crianças alérgicas. Coeficiente UN1. EC – *Escherichia coli* ATCC 25922, C.P- *Clostridium perfringens* ATCC 13124, BI- *Bifidobacterium infantis* ATCC 35624.



**Figura 17.** Dendrograma construído com 83 isolados de *Bifidobacterium* de amostras fecais de crianças não alérgicas. Coeficiente UN1. EC – *Escherichia coli* ATCC 25922, C.P- *Clostridium perfringens* ATCC 13124, BI-*Bifidobacterium infantis* ATCC 36624.

## 6. DISCUSSÃO

Alterações dos componentes bióticos e abióticos da microbiota intestinal em pacientes com diferentes alergias têm sido observadas (CLEMENTE et al., 2012; TOH et al., 2012). Em crianças com doenças alérgicas, há modificação na diversidade microbiana, caracterizada pela diminuição numérica de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., e pelo significativo aumento de espécies de *Staphylococcus* e *Clostridium* (SJOGREN et al., 2009; BISGAARD et al., 2011); entretanto, até o momento poucos são os estudos realizados sobre a microbiota de crianças com alergia às proteínas do leite de vaca.

Pelos dados demográficos apresentados na Tabela 5, destaca-se o nascimento por cesárea da maioria das crianças alérgicas (72%) em relação as não alérgicas. É possível que algum fator relacionado ao tipo de parto possa influenciar a microbiota intestinal, e conseqüentemente, o início do estado alérgico nas crianças.

Em nosso estudo, foi notada uma diversidade baixa de espécies bacterianas dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em ambos os grupos de crianças analisados; entretanto, *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. foram observados em maior número (92% e 80%, respectivamente), nas amostras fecais de crianças não alérgicas (Tabela 6 e Tabela 7), BISGAARD et al (2011) associam uma baixa diversidade de espécies na microbiota intestinal com alergias de vários tipos na infância, incluindo alergia alimentar.

Nossos resultados mostram que, em ambos os grupos de crianças, *L. rhamnosus* foi a mais predominante. Também, a análise microbiológica em crianças alérgicas na faixa de 0 a 12 meses de idade, não apresentou espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Este resultado pode ser explicado, devido à imaturidade do sistema imunológico dessas crianças nessa faixa etária, assim como também, à possível falta de receptores específicos na superfície do epitélio intestinal, o que dificultaria a colonização dessas bactérias; além disso, a maioria dessas crianças foram amamentadas com leite artificial e não o materno o que poderia explicar esse também esse resultado. Por outro lado, as crianças acima de 1 ano de idade (faixa etária de 13 meses a 10 anos), apresentaram maior diversidade bacteriana. Isto, certamente está relacionado à ingestão de alimentos sólidos e variados.

A idade da criança parece estar intimamente relacionada com a composição

microbiana do trato gastrointestinal. Estudos mostram que aos três anos de idade, as crianças apresentam entre 40% a 60% de sua microbiota gastrointestinal semelhante à de um adulto saudável (CLEMENTE et al., 2012; Yu et al., 2014; KORPELA et al., 2018). A importância da dieta na determinação da composição microbiana intestinal, está correlacionada com o início da introdução de alimentos sólidos, e coincide com o estabelecimento de uma microbiota semelhante à de um adulto (Yu et al., 2014; Avershina et al., 2014). Da mesma forma, pesquisas têm mostrado que, embora crianças de 1 a 4 anos de idade, e adolescentes apresentem suas microbiotas semelhantes à dos adultos, existem diferenças significativas nas proporções de *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., e *Clostridium* spp. (DE FILIPPO et al., 2010; AGANS et al., 2011).

*Lactobacillales* é uma ordem filogeneticamente heterogênea, composta por bactérias produtoras de ácido láctico, onde se encontra o gênero *Lactobacillus*. Em humanos, espécies deste gênero são residentes da cavidade bucal, trato gastrointestinal e vaginal (AGUIRRE e COLLINS, 1993). São consideradas probióticas, e entre os principais mecanismos de ação probiótica estudados, observa-se a capacidade de inibir patógenos pela produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Realiza a exclusão competitiva de patógenos bloqueando os sítios de adesão, competição por nutrientes e modulação do sistema imunológico, incluindo a redução da inflamação (FIGUEROA - GONZÁLEZ et al., 2011).

Os efeitos benéficos dessas bactérias probióticas e sua capacidade de modificar a composição da microbiota intestinal são atualmente bem conhecidos. Estudos têm mostrado a relação entre a presença de *L. casei* e o desenvolvimento de tolerância oral, mas os mecanismos desta associação ainda são desconhecidos (DONG et al., 2010; SCHIFFER et al., 2011). Em nosso estudo, *L. casei* foi isolado de crianças alérgicas sem tolerância oral para as proteínas do leite vaca e em crianças não alérgicas. Assim, estes resultados não esclarecem o suposto papel benéfico dessa espécie no desenvolvimento da tolerância oral, sendo necessárias mais pesquisas, utilizando cepas específicas, e analisando também, a quantidade e diversidade bacteriana que possivelmente seria eficaz para evitar as alergias alimentares.

As espécies de *Lactobacillus* fazem parte da microbiota residente humana, e

podem ser isoladas de uma variedade de infecções, como por exemplo: abscessos, cárie dental, meningite e peritonite, devido a seu comportamento oportunista (CALLAWAY et al., 2013; SANCHEZ VALVERDE et al., 2019).

*Lactobacillus rhamnosus* e *L. casei* são muito estudados devido às ações benéficas que produzem em humanos. Haro et al. (2017) administraram preventivamente de *L. casei* em pacientes com endotoxemia e conseguiram induzir uma diminuição significativa nas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, diminuindo a expressão do fator tecidual no fígado e no rim. Bubnov et al. (2017) mostraram que *L. casei* foi capaz de diminuir o peso de camundongos obesos e o nível de colesterol. Mais recentemente, Jacouton et al. (2017) mostraram que *L. casei* BL23 protegeu significativamente camundongos contra o desenvolvimento do câncer colorretal, reduzindo os índices histológicos e proliferativos. Estes achados mostram que as atividades benéficas de *L. casei* extrapolam o trato gastrointestinal e mostram o alto potencial de *L. casei* para o desenvolvimento de novas estratégias baseadas em probióticos para combater diversos tipos de carcinomas.

*Lactobacillus rhamnosus* é comumente encontrada no trato geniturinário feminino saudável e trato gastrointestinal de humanos (BUBNOV et al., 2017), e faz parte do grupo *L. casei* que compreende *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, e *L. zaeae*. Também, é conhecida como *L. rhamnosus* GG que foi primeiramente isolada em 1983 do trato intestinal humano e desde então é bem estudada como probiótica, sendo relativamente resistente ao pH ácido e à bile, adere às células epiteliais e muco intestinal, e tem se mostrado promissora no tratamento da diarreia causada por rotavírus e *Clostridium difficile* em crianças (SILVA et al., 1987; KUISMA et al., 2003; WANKE e SZAJEWSKA, 2014).

Em estudo realizado com a administração de placebo controlado contendo *Lactobacillus casei* CRL431 e *Bifidobacterium lactis* Bb12 em crianças alérgicas às proteínas do leite de vaca, durante 12 meses, não se observou a aquisição de tolerância ao leite de vaca nessas crianças. Já, em outro estudo, usando metodologia semelhante, mas com leite contendo na composição caseína extensamente hidrolisada e *L. rhamnosus* GG, essa aquisição à tolerância em crianças alérgicas foi notada, sugerindo-se que cada espécie bacteriana apresenta propriedades particulares e benéficas; entretanto, maiores estudos são necessários para confirmar esta afirmação (STEFKA et al., 2014; BERNI et al., 2017).

A literatura mostra dados controversos em relação à colonização intestinal de

*Lactobacillus* no primeiro ano de vida, sendo observados valores baixos (STARK e LEE, 1982) e elevados (HALL et al., 1990; Avershina et al., 2014). Esses dados mostram a diversidade desse grupo bacteriano dificultando a padronização numérica e analítica dos resultados obtidos para essa bactéria. Kendler et al. (2006), não encontraram nenhuma associação entre a presença de bactérias intestinais cultiváveis e a alergia alimentar ao leite, ovo, amendoim, e avelã, em crianças alérgicas, sugerindo-se que a disbiose intestinal que precede à alergia alimentar, é influenciada no início da vida e que afeta o desenvolvimento subsequente da doença alérgica, sendo de difícil detecção.

Também, nossos resultados mostram que *B. infantis* foi a mais detectada em ambos os grupos de crianças analisados. Essa bactéria pertence ao gênero *Bifidobacterium*, e é encontrada principalmente no trato gastrointestinal de adultos, e em maior quantidade em crianças. Esta espécie possui uma vantagem competitiva na presença de componentes do leite humano, podem facilmente utilizar oligossacarídeos do leite como única fonte de carbono, ocorrendo, portanto, o aumento da colonização, e diminuição da diversidade da microbiota intestinal (CHICHLOWSKI et al., 2012).

Estudos mostram que crianças com maior quantidade de *B. infantis* nas fezes, apresentaram ganho de peso, aumento do índice tímico, e melhores respostas às vacinas orais contra a poliomielite, a tuberculose, e o tétano, assim como melhora os sintomas da síndrome do intestino irritável (BRENNER et al., 2009; HUDA et al., 2014).

Bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são consideradas probióticos, e fornecem benefícios à homeostase da microbiota intestinal. Numericamente, essas bactérias foram predominantes em crianças de 13 meses a 10 anos de idade. Esses resultados concordam com os resultados apresentados por Fernandes et al. (2016), que analisaram amostras fecais de crianças de 6 a 10 anos de idade, encontrando-se elevada prevalência dessas bactérias.

Espécies de *Clostridium* foram detectadas em 60% das amostras fecais de crianças alérgicas, e em 36% nas amostras de crianças sem alergia. As espécies *C. septicum* e *C. innocuum* foram as mais prevalentes em alérgicos, enquanto que, *Clostridium* spp. foi a mais prevalente em crianças não alérgicas, considerando-se o número de material clínico positivo para essas bactérias.

*Clostridium septicum* faz parte da microbiota intestinal de humanos e outros

animais, mas pode ser encontrado em diversos outros ambientes anóxicos que contenham compostos orgânicos. Considerado patógeno oportunista, as raras infecções por *C. septicum* são encontradas em indivíduos com história recente de trauma, cirurgia, doença vascular periférica, diabetes, câncer de cólon, infecções da pele ou queimaduras (SMITH et al., 2015). Há relato da presença de *C. septicum* em casos mais agressivos da gangrena gasosa em adultos, inclusive pacientes com câncer de cólon, que progridem rapidamente, com elevada taxa de mortalidade. Também já foi descrito casos de sepse causada por *C. septicum* em criança com neutropenia autoimune (CASTILLO et al., 2004; NANJAPPA et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2017).

Infecções por *Clostridium innocum* em seres humanos são incomuns, Crum-Cianflone (2009) descreve o primeiro caso publicado de bacteremia por *C. innocuum* em pacientes com AIDS sugerindo-se que a co-infecção por *C. difficile* pode ser um fator de risco para o desenvolvimento subsequente de bacteremia por essa bactéria, inclusive em crianças. Essas espécies de *Clostridium* fazem parte da microbiota intestinal de humanos; entretanto, possíveis alterações no ecossistema intestinal podem interferir no aumento ou diminuição desses grupos bacterianos.

Em 2011, WALIGORA-DUPRIET et al., determinaram a presença de *C. butyricum* e *C. paraputrificum* em crianças com alergia às proteínas do leite de vaca. Em nosso estudo, também foi detectada a presença dessas duas espécies em crianças alérgicas; porém, *C. butyricum* foi detectada somente nas crianças alérgicas que fazem reposição de cálcio. Esse microrganismo tem como habitat o solo e fezes de crianças e adultos saudáveis, e cepas toxigênicas podem produzir toxina botulínica tipos E.

Crianças que sofrem de alergia a produtos lácteos, com frequência precisam de reposição nutricional, visando o desenvolvimento mental e o equilíbrio fisiológico e metabólico da microbiota intestinal (RONA, 2007). A reposição de macro e micronutrientes é sugerida de acordo com critérios médicos, avaliando-se a necessidade individual do paciente. Em nosso estudo, foram incluídas 25 crianças alérgicas, das quais 15 delas fizeram reposição de cálcio, e isto, não influenciou os sintomas alérgicos ou o desenvolvimento da tolerância oral.

A presença de *B. fragilis*, *B. vulgatus*, e *P. distasonis* também foi observada em crianças > 13 meses de idade não alérgicas. Essas espécies colonizam a microbiota intestinal desde as primeiras semanas de vida; entretanto, as crianças

alérgicas com até 12 meses de vida não apresentaram isolados de *P. distasonis* e *B. fragilis*, e somente em uma criança alérgica > 13 meses de idade participantes do estudo foi isolada a espécie *B. vulgatus*, esta diferença pode notada, talvez, pela quantidade baixa de amostra fecal de criança alérgica > 13 meses de idade. Ainda assim, estudos têm mostrado que possíveis alterações quantitativas e qualitativas na microbiota intestinal podem ocorrer em diferentes faixas etárias, contudo, ainda há pouca informação disponível na literatura sobre a real causa dessas alterações, bem como os efeitos sobre o hospedeiro (ADLERBERTH, 2008; Grzeskowiak et al., 2012).

Chen et al. (2016), mostraram que as crianças com alergia alimentar no início da vida apresentam microbiota fecal alterada, com pequena diversidade bacteriana em comparação às crianças saudáveis, ressaltando-se o menor número de *Bacteroidetes* e número significativamente maior de *Firmicutes*.

A determinação quantitativa bacteriana, embora não nos permita definir os grupos predominantes em cada grupo de crianças, apontou que espécies do filo *Bacteroidetes* e da família *Bacteroidaceae* foram as mais predominantes em ambos os grupos avaliados, contudo com maior representação no grupo das crianças com alergia. Entretanto, valores estatisticamente significativos foram observados para *C. perfringens* ( $p = 0,037$ ), *Clostridium* Cluster I ( $p = 0,005$ ), *E. coli* ( $p = 0,001$ ), e *Bacteroidetes* ( $p = 0,051$ ) Estes dados quantitativos reforçam nossos resultados qualitativos, sugerindo que algum outro fator, pode interferir qualitativa e quantitativamente na presença de algumas espécies bacterianas avaliadas. Cabe ressaltar que, os valores obtidos para *Clostridium* Cluster I e *C. difficile*, refletem a ausência dessas bactérias nos dois grupos de crianças avaliadas.

SONGJINDA et al. (2007), avaliando o material fecal de crianças de 2 anos de idade com alergia alimentar, observaram a diminuição de *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroidetes*. Entretanto, em nosso estudo, os resultados quantitativos mostraram uma quantidade relativamente alta dessas bactérias que fazem parte da microbiota residente intestinal desde o início da sua formação.

Interessantemente, espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Parabacteroides* não apresentaram diferenças entre as espécies isoladas em ambos os grupos de crianças, e isto, pode representar algum predomínio desses microrganismos no trato intestinal de crianças. Contudo, quando se analisou a presença de espécies pertencentes ao gênero *Clostridium*, se nota uma acentuada

presença de espécies diferentes em crianças com APLV, tais como *C. difficile*, *C. paraputrificum*, *C. baratti* e *C. perfringens*. Certamente, isto pode representar a disbiose que ocorre no trato intestinal dessas crianças, o que talvez as torne mais propensas ao desenvolvimento de infecções.

Rutayisire et al. (2016), relataram que o nascimento por cesariana estaria relacionado à menor quantidade e diversidade de *Bacteroidetes*, e à maior abundância de *Firmicutes*, sugerindo que este processo ocorre desde o nascimento até os 3 meses de vida. Também, a maioria das crianças alérgicas nasceu por cesárea, e apresentaram pequena quantidade dos dois filos anteriormente mencionados, em relação às crianças sem alergia. Esta divergência, pode estar relacionada com o aumento da idade das crianças selecionada para o estudo. Entretanto, o isolamento do gênero *Bifidobacterium* foi mais frequente em bebês nascidos de parto normal em comparação àqueles nascidos por cesárea em ambos os grupos estudados.

Azad et al. (2015), relataram que lactentes alérgicos mostram elevada colonização de *Bacteroides* e menor colonização de *Clostridium*, sendo sugerido alguma relação antagônica entre esses grupos bacterianos, devido à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos por esses microrganismos.

*Clostridium* Cluster I agrupa espécies de relevância médica, como, *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. chauvoei*, e *C. perfringens*, (LINDSTROM, 2010; POEHLEIN et al., 2015), mas também, agrupa membros não patogênicos, os quais colaboram com a diversidade metabólica degradando carboidratos, e produzindo solventes e hidrogênio (SCHELLENBERGER, 2010). Embora, *C. perfringens* faça parte de *Clostridium* Cluster I, a presença desse microrganismo, em ambos os grupos de crianças avaliadas, mostrou diferença estatisticamente significativa.

A análise quantitativa de bactérias *Archaea* também mostrou valores baixos em ambos os grupos de crianças analisadas. Este domínio bacteriano abriga espécies conhecidas por habitar ambientes considerados extremos (sendo conhecidas como bactérias extremófilas). As *Archaea* metanogênicas mais descritas no intestino humano são, *Methanobrevibacter smithii* e *Methanosphaera stadtmanae*. *M. smithii* utiliza H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> ou formiato para formar metano, enquanto, *M. stadtmanae* utiliza metanol que é liberado na degradação anaeróbia da pectina, realizado também, por espécies de *Bacteroides* (FRICKE et al., 2006).

Estudo comparativo entre as microbiotas de crianças e de adultos aponta que

uma microbiota madura (de adulto) apresenta maior quantidade de *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, enquanto que, em crianças espera-se que espécies de *E. coli* e *Bifidobacterium* estejam presentes em maior quantidade (MARIAT et al., 2009). Em nosso estudo, foi notado um maior número de *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *E. coli* em crianças saudáveis não alérgicas, valores semelhantes aos obtidos por Francavilla et al. (2012).

A microbiota residente humana é uma comunidade densa, complexa e diversificada, e a aplicação de técnicas de sequenciamento, como metagenômica, metatranscriptômica, e metaproteômica, aliadas às ferramentas complementares de bioinformática, podem caracterizar com precisão as alterações da composição e função de microrganismos, assim como, suas influências no metabolismo do hospedeiro e nas patologias associadas (MANDAL et al., 2015).

Isto faz com que, seja necessário o emprego de outras técnicas alternativas para a identificação e genotipagem dessas espécies, tais como PCR baseado em sequência repetitiva (Rep-PCR), polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD e AP-PCR), polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), e eletroforese de campo pulsado (PFGE), sequenciamento *shotgun* entre outras (SOCRANSKY et al., 2004; PAOLO, 2009; KORPELA et al, 2018).

A diversidade genética das espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foi realizada pela técnica AP-PCR, na qual o primer arbitrário OPA-03 mostrou ser discriminatório. Assim, essa técnica permitiu a obtenção de dendrogramas com agrupamentos genéticos para cada grupo analisado. Entretanto, é relatado que a combinação de técnicas permitiria uma melhor diferenciação genética entre as espécies microbianas (PAOLO, 2008). Assim como ELLEGAARD et al. (2015), utilizaram sequenciamento de DNA em estudo filogenético com espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e mostrando elevada similaridade genética.

Os dendrogramas obtidos com as espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, em ambos os grupos de crianças analisados, mostraram, como esperado, uma diversidade genética heterogênea, assim como também, mostrou clones bacterianos, constituídos na maioria das vezes por bactérias isoladas do mesmo paciente.

Interessantemente, as bactérias isoladas de crianças não alérgicas formaram agrupamentos genéticos com maior número de clones para os dois gêneros bacterianos analisados. Como mencionado anteriormente, fatores intrínsecos e/ou

extrínsecos como alimentação, reposição de cálcio e presença em ambiente hospitalar, podem ser a causa da maior diversidade nos isolados obtidos de crianças alérgicas. Estes resultados sugerem que, a aplicação de técnicas moleculares mais precisas como sequenciamento de DNA seria necessária para melhor definir o grau de diversidade genética dessas bactérias, como por exemplo MLST.

Os dendrogramas formados mostram que, a presença de isolados constituindo clones foi ligeiramente maior em crianças não alérgicas. Quanto à diversidade genética de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, se observou, como esperado, uma baixa diversidade e elevada heterogeneidade entre esses microrganismos, o que poderia ser melhor avaliado utilizando métodos mais sensíveis

A caracterização da microbiota intestinal em portadores de alergia alimentar é preliminar devido aos múltiplos fatores que influenciam sua composição; embora, existam evidências da associação da disbiose da microbiota intestinal com a alergia alimentar, a heterogeneidade observada nos estudos, incluindo a idade das crianças avaliadas, tipo de amostras e métodos utilizados, tornam difícil estabelecer uma clara correlação entre grupos bacterianos específicos e o desenvolvimento da alergia.

## 7. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos neste estudo podemos concluir que:

1. As crianças com alergia ao leite de vaca apresentaram maior número de espécies do gênero *Clostridium*;
2. Pela análise quantitativa, as crianças não alérgicas apresentaram maior número de bactérias pertencentes aos gêneros: *Bifidobacterium*, e *Clostridium* Cluster I; aos filos: *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e a espécie *Escherichia coli*; e
3. As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* de ambos os grupos de crianças mostraram diversidade genética heterogênea.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. et al. **Imunologia Celular e Molecular**, 8<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

ADLERBERTH, I.; WOLD, A. Establishment of the gut microbiota in Western **Infants**. **Acta. Pediatr.**, v.98, p.229-238, 2009.

AGANS, R. et al. The distal intestinal microbiota of adolescents is different from that of adults. **FEMS Microbiol Ecol.**, v 77 (2), p. 404-412, 2011.

AGUIRRE, M.; COLLINS, M. D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. **Journal of Applied Bacteriology.**, v.75 (1), p.95-107, 1993.

AITORO, R. et al. Gut Microbiota as a target for preventive and therapeutic intervention against food allergy. **Nutrients.**, v 9 (7), p.672, 2017.

ALBENBERG, L. G.; WU, G. D. Diet and intestinal microbiome: associations, functions and implications for health and diseases. **Gastroenterol.**, v 146, p. 1564-1572, 2014.

ARON-WISNEWSKY, J. et al. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery- nature reviews. **Gastroenterology & Hepatology.**, v 16, p.1-10, 2012.

ARRIETA, M. C. et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. **Sci. Transl. Med.**, v 7 (307), p. 307-152, 2015.

AVERSHINA, E. et al. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. **FEMS Microbiol Ecol.**, v 87,p .280 -290, 2014.

AZAD, M. B.; KONYA, T. Infant gut microbiota and food sensitization: Associations in the first year of life. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 45, p.623–643, 2015.

BACKHED, F. et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. **Cell Host Microbe.**, v 13;17(5), p. 690-703. 2015.

BALDO, L. Suplementação de cálcio na dieta sem lactose. **Sem Lactose**, 2008.

BARTUZI, Z. et al. Contribution of molecular allergen analysis in diagnosis of milk allergy. **Curr Allergy. Asthma Rep.**, v 17(7), p 46, 2017.

BERNI CANANI, R. et al. Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.139, p.1906–1913, 2017.

BISGAARD, H. et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 128, p. 646- 652, 2011.

BOUHNIK, Y. et al. The ability of non-digestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group, dose-response relationship. **Am. J. Clin. Nutr.**, v 80, p.1658-1664, 2004.

BOUSQUET, J. et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. **Allergy.**, v 67, p 18 - 24, 2012.

BUTEL, M.J. et al. The developing gut microbiota and its consequences for health. **Journal of Devel. Origins of Health and Disease.**, v 9 (6), p. 590-597, 2018.

BRANUM, A. M.; LUKACS, S. L. Food allergy among children in the United States. **Pediatrics.**, v 124 (6), p 1549-555, 2009.

BRENNER, D. M. et al. The usefulness of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. **Am J Gastroenterol.**, v.104 (4), p. 49-1033, 2009.

BRILL, H. Approach to milk protein in infants. **Can. Family Physician.**, v. 54.p. 64-1258, 2008.

BUBNOV, R. V., et al. Comparative study of the probiotic effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains on cholesterol levels, liver morphology and intestinal microbiota in obese mice. **J. EPMA** ., v.8(4), p. 357-376, 2017.

BUENO, A. L.; CZEPIELEWSKI, M. A. The importance of dietary intake of calcium and vitamin D in growth. **J. Pediatr.**,v 84(5), p 386-394, 2018.

BUZINARO, E. F. et al. Biodisponibilidade do cálcio dietético. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50 (5), p. 852-861, 2006.

CAFFARELLI, C. et al. Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. **Ital. J. Pediatr.**,v 36 (5), 2010.

CAICEDO. M. Probiotics: protecting the intestinal ecosystem? **J. Pediatr.**, v 147, p. 143-146, 2005.

CALLAWAY, A. et al. Identification of Lactobacilli from deep lesions of caries by means of mass spectrometry specific for PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. **Clin. Lab.**, v 59 (11-12), p.1373-1379, 2013.

CALLE, A' et al., Anaphylaxis in a lactating infant who is allergic to cow's milk protein. **Rev Alerg Mex.**, v 66, p. 123-127, 2019.

CASTILLO, A. M. et al. Sepsis por *Clostridium septicum* em criança com neutropenia auto-imune. **Ver. Nascer e crescer.**, v. 13(4), p.352-354, 2004.

CHEN, C. C. et al. Alterations in the gut microbiota of children with food sensitization

in early life. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v 27, p. 254–262, 2016.

CHICHLOWSKI, M. et al. *Bifidobacteria* isolated from infants and cultured in human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.55, p.7-321, 2012.

CLEMENTE, J. C. et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell.**, v. 148.p.1258–1270, 2012.

CONWAY, K.D. Modulation bacterial mucosa and innate immunity. **Mol. Immunol.**, v 42, p 895-901, 2005.

COTTER, P. D. et al. The impact of antibiotics on the intestinal microbiota, as revealed by the high level of DNA sequencing. **Discov. Med.**, v 70, p. 193-199, 2012.

CRUM-CIANFLONE, N. *Clostridium innocuum* bacteremia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Med. Sci.**, v.337(6), p. 2-480, 2009.

DAHER, S. et al. Diagnóstico em doenças alérgicas mediadas por IgE. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, v 32(1), p :3-8, 2009.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet on the formation of intestinal microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v 107(33), p.14691-14696, 2010.

DE GREGORIS, T. B. et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **J. Microbiol. Methods.**, v. 86, p. 351–356, 2011.

DEL MORAL, M. G.; Naves, M, E. The role of lipids in development of allergic responses. **Immune. Net.**, v 17 (3), p. 133-143, 2017.

DETHLEFSEN, L.; RELMAN, D. A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation.

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v108, p 454–456, 2011.

DOMINGUEZ- BELLO, M. G. et al. The mode of delivery shapes the acquisition and structure of the initial microbiota in various body habitats in newborns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v 107 (26), p. 11971-11975, 2010.

DONG, H. et al. Effects of *Lactobacillus casei Shirota* on immune function. **Proc. Nutr. Soc. – Engl. Scot.**, v. 69. p. E243, 2010.

DUPONT, C. Food allergy: recent advances in pathophysiology and diagnosis. **Ann Nutr Metab.**, v 59 (1), p 8-18, 2011.

ELE, S. et al. Development of sandwich ELISA to test bovine  $\beta$ -lactoglobulin allergen residues by specific polyclonal antibody against human IgE binding epitopes. *Food Chem.*, v 227, p 33-40, 2017.

ELLEGAARD, K. M. et al. Extensive intra-phylo-type diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. *BMC Genomics.*, v 16, p. 284, 2015.

FERNANDES, M. R. et al. Alterations of intestinal microbiome by antibiotic therapy in hospitalized children. *Microbial drug resistance.*, v 23 (1), 2017.

FERNANDÉZ-ORTEGA, M. Consumo de fuentes de calcio en adolescentes mujeres em Panamá. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v 58 (3), p 286- 291, 2008.

FERREIRA, C. E. A. et al. Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in children with acute diarrhea in São Paulo City, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v 98, p 451-454, 2003.

FERREIRA, C. T. et al. Food allergy: A practical update from the gastroenterological viewpoint. **J. Pediat.**, v. 83, p. 7-20, 2007.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, I. et al. A Probiotics and prebiotics - perceptions and challenges. **J. Sci. Food Agric.**, v.91, p.1341-1348, 2011.

FIOCCHI, A. et al. Diagnosis and justification for action against cow's milk allergy (DRACMA): a summary report **J. Allergy Clin. Immunol.**, v 3, p, 57-61, 2010.

FIOCCHI, A. et al. Cow's milk allergy: towards an update of DRACMA guidelines. **World Allergy Organization J.**, v 9, p 35, 2016.

FLOKSTRA-DE BLOK, B. M. et al. Health-related quality of life of food allergic patients: comparison with the general population and other diseases. **Allergy.**, v 65 (20), p 238- 244, 2010.

FRANCAVILLA R, CALASSO M, et.al. Effect of lactose on gut microbiota and metabolome of infants with cow's milk allergy. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v.23, p. 420–427, 2012.

FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, p. 13780–13785, 2007.

FRICKE, W. F. et al. The sequence of the genome of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human argon is restricted to methanol and H<sub>2</sub> for the formation of methane and synthesis of ATP. **J. Bact.**, v.188, p.642–658, 2006.

FUNKHOUSER, L. J., BORDENSTEIN, R. S. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. **PLoS Biol.**, v. 11, p.e1001631, 2013.

GARCIA, P. G. et al. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. **J. Microbiol.**, v. 49, p. 46-52, 2011.

GAREAU, M. G. et al. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v 7, p 503- 514, 2010.

GILBERT, J.A. et al. Current understanding of the human microbiome. **Nature Medicine.**, v 24, p. 393-400, 2018.

GOLDBOHM, R. A. Et al. Dairy consumption and 10-y total and cardiovascular mortality: a prospective cohort study in the Netherlands. **Am. J. Clin. Nutr.**, v 96, p 615-627, 2011.

GOPALAKRISHNAN, V. et al. The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. **Cancer Cell.** v 33(4), p 570-580, 2018.

GRAY, C. L. et al. Ethnic differences in peanut allergy patterns in South African children with atopic dermatitis. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v 26 (8), p 721-730, 2015.

GRZESKOWIAK L, et al. Distinct gut microbiota in southeastern African and northern European infants. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v 54, p.812 - 816, 2012.

Guia prático da APLV mediada pela IgE - ASBAI & SBAN. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, v 35 (6), 2012.

GUSHKEN, A. K. et al. Double-blind, placebo-controlled food challenges in Brazilian children: adaptation to clinical practice. **Allergol Immunopathol.**, v 41, p 94-101, 2013.

HAARMAN, M.; KNOL, J . Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal Bifidobacterium species in infants receiving a prebiotic infant formula. **Appl. Environ. Microbiol.**, v 71 (5), p. 2318-2324, 2005.

HALL, M. A. et al. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli on early infancy. **Arch. Dis. Child.**, v.65, p. 88-185, 1990.

HARO, C.; MÓNACO, M.E.; MEDINA. M. *Lactobacillus casei* beneficially modulates the immunocagulative response in a model of endotoxemia. **Blood Coagul Fibrinolysis.**, v.29 (1), p. 104-110, 2018.

HEINE, R. G. et al. Cow's milk allergy in infancy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 2, p. 25-217, 2002.

HILL, M. J.; DRASAR, B. S. The normal colonic bacterial flora. **Gut.**, v.16, p.318-323, 1975.

HOPPU, U. et al. Dietary habits and nutrient intake of finnish adolescents. **Public Health Nutri.**, v 13 . p 965- 972, 2010.

HUDA, M. N. et al. Microbiota of feces and vaccine responses of infants. **Pediatrics.**, v. 134 (4), p. 72-362, 2014.

INUO C. et al. Tolerability of partially and extensively hydrolysed milk formulas in children with cow's milk allergy. **Asia Pac J Clin Nutr.**, v.28(1), p.:49-56, 2019..

IOM - Institute of Medicine of the National Academy. Dietary Reference Intakes for calcium and vitamin D. **Report Brief.** November, 2010.

ISOLAURI, E. et al. Elimination diet in cow's milk allergy: risk for impaired growth in youngchildren. **J. Pediatr.**, v 132, p 1004- 1008, 1998.

JACKSON, M. S. et al. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human faeces. **J. Microbiol Meth.**, v 51, p 313-321, 2002.

JACOUTON, E. et al. Estirpe probiotic *Lactobacillus casei* BL23 probiotic strain prevents colorectal cancer associated with colitis. **Frontiers in immunol.**, v. 4, p. 1553, 2017.

JEONG, K. et al. Age-Based causes and clinical characteristics of immediate-type food allergy in korean children. **Allergy Asthma Immunol. Res.**, v 9(5), p. 423-430, 2017.

JIMENEZ, E. et al. Is the meconium of healthy newborns really sterile? **Res.**

**Microbiol.**, v 159 (3), p.187-193, 2008.

KALLIOMÄKI, M. et al. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative reduction in the risk of eczema in a randomized, placebo-controlled study. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.119 (4), p. 21-1019, 2007.

KANAI, T. et al. Diet, microbiota and inflammatory bowel disease: Japanese food lessons. **Korean J Intern Med.**, v 29(4), p. 409- 415, 2014.

KANSU, A, et al. A consensus statement on the diagnosis, treatment and monitoring of cow's milk protein allergy among infants and children in Turkey. **J. Pediatr.**, v 58(1), p 1-11, 2016.

KANG, S. et al. Fecal microbiota dysbiosis in patients with Crohn's disease as revealed by a custom phylogenetic microarray. **Inflamm Bowel Dis.**, v 16, p. 2034-2042, 2010.

KENDLER, M. et al. Comparison of fecal microflora in children with atopic eczema/dermatitis syndrome according to IgE sensitization to food. **Pediatr. Allergy Immunol.**,v.17, p.141–147, 2006.

KIEWIET, M. B. G . et al. Partially hydrolyzed whey proteins prevent clinical symptoms in a cow's milk allergy mouse model and enhance regulatory T and B cell frequencies. **Mol. Nutr. Food Res.**, v 61(11), 12p, 2017.

KIM, K. S.; HONG, S. W. Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. **Science**, v 351, p. 858–863, 2016.

KORPELA, K. et al. Selective maternal seeding and environment shape the human gut microbiome. **Genome Res.**, v 28(4), p. 561-568, 2018.

KUISMA, J. et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on inflammation of the ileal pouch and microbial flora. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 17 (4), p. 15-509, 2003.

KWEON, M. N. Et al. Systematically derived intestinal CD4 (+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. **J. Clin. Invest.**, v 106, p 199-206, 2000.

LANDMAN, C. et al. Gut microbiota: Description, role and pathophysiological implications. **Rev. Med. Intern.**, v 37(6), p. 418- 423, 2015.

LATTINEN, K. et al. Management of foos allergy: vitamin, fatty acids or probiotics? **Eur J. Gastroenterol Hepatol.**, v 17, p 1305-1311, 2017.

LE CHATELIER, E. et al. The richness of the human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v 500 (7464), p. 541-546, 2013.

LEE, D. H. et al. Quantitative detection of residual *E. coli* host cell DNA by Real-Time PCR. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.20, p.1463–1470, 2010.

LEE, J. B. Regulation of IgE-mediated food allergy by IL-9 producing mucosal mast cells and type 2 innate lymphoid cells. **Immune New.**, v 16 (4), p 211-218, 2016.

LINDSTROM, M. et al. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. **Crit. Rev. Food.**, v. 50(4), p. 281–304, 2010.

LIVINGSTON, S. J. et al. New medium for selective and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. **J. Clin. Microbiol.**, v 7, p 448-453,1978.

LIU, C. et al. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. **FEMS Microbiology Letters.**, v. 222, p. 9-16, 2003.

MANDAL, R. S. et al. Metagenomic surveys of gut microbiota. **Genomics Proteomics Bioinformatics.** V. 13, p. 148-158, 2015.

MARCOBAL, A. et al. *Bacteroides* in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. **Cell Host Microbe.**, v 10, p 507–514, 2011.

MARIAT, D. et al. The *Firmicutes/ Bacteroides* ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiol.**, v.9,123-128, 2009.

MARTINI, L. A. et al. Prevalence and correlates of calcium and vitamin D adequacy in adolescents, adults, and elderly from the Health Survey. **Nutrition**, v 29, p. 845-850, 2013.

MATANGKASOMBUT, P. et al. Detection of  $\beta$ -lactoglobulin in human breast milk 7 days after the ingestion of cow's milk. **Paediatr Int Child Health.**, v 37(3), p 199-203, 2017.

MAZMANIAN, S. K . et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs the maturation of the host's immune system. **Cell.**, v 122 (1), p. 107-118, 2005.

MEVISSSEN-VERHAGE, E. A. et al. *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, and *Clostridium* spp. in fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. **J Clin Microbiol.**, v 25, p. 285–289, 1987.

MILLS S. et al. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. **Int Dairy J.**, v 21, p 377-401, 2011.

MIRAGLIA DEL GLUDICE, M. et al. Flavor, relative palatability and components of hydrolyzed cow's milk formula and amino acid-based formula. **Ital J Pediatr.**, v 41(42), 2015.

MORIYAMA, T. Diversity of Food Allergy. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).**, v 61,p. 106-108, 2015.

MUNIZ, L. C. et al. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Ciênc Saúde Coletiva.**, v18 (12),p 3515-3522, 2013.

MURANO, A., et al. EAACI - Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: diagnosis and management of food allergy. **Allergy.**, v 69 (8), p 1008-1025, 2014.

NANJAPPA, S. et al. *Clostridium septicum* gas gangrene in colon cancer: Importance of early diagnosis. **Case Rep Infect Dis.**, v.2015, 3p, 2015.

NEBRA, Y. et al. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. **App. Env. Microbiol.**, v 65, p 5173-5176, 1999.

NORO, G. et al. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.35, p.1129- 1135, 2006.

NOWAK-WEGRZYN, A. ; SAMPSON, H. A. Adverse reactions to food. **Med Clin North Am.** v 90 (1), p. 97- 127, 2006.

O'HARA, A. et al. The gut flora as a forgotten organ. **Reports Emb.**, v 7, p 688-693, 2006.

PAOLO, C. C. F; MALTZ, M. Estudo de *Lactobacillus* no biofilme oral. 2009. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition.**, v 30(6), p 619-627, 2014.

PETERSEN, C. et al. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. **Cell Microbiol.**, v 16, p 1024-1033, 2014.

PETERSON, D. A. Ig A response to symbiotic bacteria as mediator of intestinal homeostasis. **Cell Host Microbe.**, v 2, p. 328 - 339, 2007.

PHILIPPI, ST. Pirâmide dos alimentos. Fundamentos básicos da nutrição. **Barueri Manole.**, ed 2, 2013.

PLUNKETT, C. H.; NAGLER, C. R. The Influence of the microbiome on allergic sensitization to food. **J. Immunol.**, v 198, p. 581–589, 2017.

POEHLEIN, A. et al. The complete *Clostridium acetone* genome sequence: A lost link between the autotrophic acetogens containing Rnf and cytochrome. **mBio.**, v 6 (5), p 1168-15, 2015.

PONNUSAMY, K. et al. Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. **J. Med. Microbiol.**, v.60, p.817-827,2011.

PRAKASH, S. et al. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. **J. Biomed. Biotechnol.** , v 2011, 981214 2011.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature.**, v 464, p.59–65, 2010.

RINNE, M. M et al. Similar bifidogenic effects of partially hydrolyzed infant formula supplemented with prebiotics and breastfeeding in the baby's intestinal microbiota. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v 43 (1), p. 59- 65, 2005.

RINTTILA, T. et al. 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.

RONA, J. et al. The prevalence of food allergy: a meta- analysis. **Allergy Clin. Immunol. J.**, v.120, p. 638-646, 2007.

RUTAYISIRE, E. et al. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the intestinal microbiota during the first year of the infant's life: a systematic review. **BMC Gastroenterol** ., v.16, p.86, 2016.

SANTALHA, M. et al. Alergia alimentar em idade pediátrica. **Nascer e Crescer.**,

v.22 (2), p. 75 - 79, 2013.

SAMPSON, H. A. Update on food allergy. **Curr. Rev. allergy Clin immunol.**, v 113, p 805-819, 2004.

**SÁNCHEZ-VALVERDE, F.** et al. Factors Associated with the Development of Immune Tolerance in Children with Cow's Milk Allergy. **Int Arch Allergy Immuno.**, v 16, p. 1-7, 2019.

SATOKARI, R. et al. *Bifidobacterium* DNA and *Lactobacillus* in human placenta. **Lett Appl Microbiol.**, v 48 (1), p. 8- 12, 2009.

SCHIESS, S. A. et al. Introduction of potentially allergenic foods in the Infant's diet during the first years of life in five European countries. **Ann Nutr Metab.**, v 58(2), p 109–117, 2011.

SCHELLENBERGER, S. et al. Metabolic responses of novel cellulolytic and saccharolytic agricultural soil bacteria to oxygen. **Environ. Microbiol.**, v 12(4), p.845–861, 2010.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Allergy food. **J Allergy Clin Immunol.**, V 117(2), p 470-475, 2006.

SICHERER, S. H. Epidemiology of food allergy. **J Allergy Clin Immunol** v.127 (3), p 594-602, 2011.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades-degradações-modificações. **São Paulo: Varela**; 1996. 517p.

SHAKER M. New insights into the allergic march. **Curr Opin Pediatr.**, v 26(4), p 516–520, 2014.

SHULMAN, S. T. et al. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? **Clin Infect Dis.**, v 45, p 1025- 1029, 2007.

SILVA, M. et al. Antimicrobial substance of a human strain of *Lactobacillus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.31(8), p.3-1231, 1987.

SIRAGUSA, G. R. et al. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one-to three week old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic free vegetables based diets. **J. App. Microbiol.**, v. 102, p.1138-1149, 2007.

SJOGREN, Y. M.; JENMALM, M. C., BOTTCHER, M. F., et al. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. **Clin Exp Allergy.**, v.39, p. 518–526, 2009.

SMITH- BROWN, P. et al. Mothers secretor status affects development of childrens microbiota composition and function: A pilot study. **PLoS ONE. Journal.Pone.**, v.11(9), 2016.

SOCRANSKY, S. S. et al. Use of checkerboard DNADNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiol. Immunol.**, v 19, p. 352– 362, 2004.

SONGJINDA, P. et al. Differences in the development of the intestinal microbiota among allergic and non-allergic children: a pilot study in Japan. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v 71 (9), p. 2338- 2342, 2007.

SOUZA, G. T. et al. Dietary whey protein lessens several risks factors for metabolic diseases: a review. **Lipids Health Dis.**v 11, p 67, 2012.

SRIVASTAVA, I . et al. Spontaneous gas gangrene by *C. septicum*: literature review. **Anaerobe.**, v 48, p.165-171, 2017.

STARK, P. L; LEE, A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. **J. Med. Microbiol.**, v.15, p.189-203, 1982.

STEWART, J.A. et al. Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. **J Med Microbiol.**, v.54,p.1239 -1242,2005.

STEFKA, A. T. et al. Commensal bacteria protect against sensitization of food allergens. **Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.**, v.111, p.13145-13150, 2014.

SZAJEWSKA, H. et al. Use of probiotics for managing acute gastroenteritis: A position paper from the ESPGHAN Working Group on Probiotics and Prebiotics. **J. Pediatric Gastroenterol. Nutrition.**, v.58(4),p. 9-531, 2014.

TAMBURINI, S. et al. The microbiome in early life: implications for health outcomes. **Nat Med.**, v 22(7), p. 713- 722, 2016.

TAYLOR-BLACK, S.; WANG, J. The prevalence and characteristics of food allergy in urban minority children. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v 109 (6), p 7-431,2012.

TOH, Z. Q. et al. Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease. **Front Pharmacol.**, v. 3, p.171,2012.

TURNBAUGH, P. J. et al. The human microbiome project. **Nature.**, v 7164, p 804-810, 2007.

UNCUOGLU, A. et al. Tolerance to boiled and fermented cow's milk in children with IgE-mediated and non-IgE-mediated cow's milk allergy in patients less than two years of age. **Allergol Immunopathol (Madr).**, v 45(6), p 560-566, 2017.

USAI-SATTA, P. et al. Lactose malabsorption and intolerance: What should be the best clinical management? **World J Gastrointest Pharmacol Ther.**, v 3, p 29-33, 2012.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiological Reviews.**, v. 60, p.407-438,1996.

VAN DEN ELSEN, L.W.J.et al. Shaping the Gut Microbiota by Breastfeeding: The Gateway to Allergy Prevention?. **Front Pediatr.**,v.27.p.7-47, 2019.

VAN HUL, M. et al. The reduction of obesity, diabetes, and steatosis over cinnamon and grape marc are associated with changes in intestinal microbiota and intestinal barrier markers. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v 314(4), p.334-352, 2017.

VANDENPLAS, Y. Lactose intolerance. **Asia Pac J Clin Nutr.**, v 24(1), p 9-13, 2015.

VENTER, C. et al. Impact of elimination diets on nutrition and growth in children with multiple food allergies. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.**, v 17(3), p 220-226, 2017.

WALIGORA-DUPRIET, J. A. et al. Diversity of gut Bifidobacterium species is not altered between allergic and non-allergic French infants, **Anaerobe.**, v.17, p. 91-96, 2011.

WANG, Y. et al. The culture supernatant of *Lactobacillus Rhamnosus* GG improves acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury. **American J. Physiol.**, v . 303 (1), p.32- 41, 2012.

WANKE, M.; SZAJEWSKA, H. Probiotics to prevent health-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Pediatr. Polska.**, v. 89, p.16-8, 2014.

WASERMAN, S.; WATSON, W. Food allergy. **Allergy, Asthma & Clinical.**, v 7, p 1-7, 2011.

WINKLER, I. Interpreting the incompatibility negativity (MMN). **J. Psychophysiol.**, v 21, p. 147- 163, 2007.

WINKLER, P. et al. Molecular and cellular basis of microflora host interactions. **J. Nutr.**, v.137, p. 756S-772S, 2007.

WOOD, R. A. et al. The natural history of food allergy. **Pediatrics.**, v 111, p 1631-

1637, 2013.

YOUN, S. Y. et al. Evaluation of the PCR method for identification of *Bifidobacterium* species. **Lett. Applied Microbiol.**, v 46(1), p. 7-13, 2008.

YU, Z. T., et al. The major fucosylated human milk oligosaccharides have prebiotic properties in cultured infant microbiota. **Glycobiology.**, v 23, p. 169-177, 2013.