NADIA SANDRA OROZCO VARGAS

Caracterização do microbioma intestinal em recém nascidos com defeitos congênitos do trato gastrointestinal submetidos à correção cirúrgica

São Paulo

2022

NADIA SANDRA OROZCO VARGAS

Caracterização do microbioma intestinal em recém nascidos com defeitos congênitos do trato gastrointestinal submetidos à correção cirúrgica

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vargas, Nadia Sandra Orozco
Caracterização do microbioma intestinal em recém nascidos com defeitos congênitos do trato gastrointestinal submetidos à correção cirúrgica / Nadia Sandra Orozco Vargas. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon.

Descritores: 1.Microbiota 2.Gastrosquise 3.Hérnia umbilical 4.Cirurgia 5.Trato gastrointestinal 6.Recém-nascido

USP/FM/DBD-243/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

A Deus, nosso amado Pai, que inspira meu viver e guia meu caminhar.

A todos os recém-nascidos e a seus pais que, anonimamente, participaram desta pesquisa e compartilharam a experiência única de gerar uma nova vida.

Aos meus tesouros e adoráveis filhos Dayanne e Johan, pela motivação em viver, crescer e persistir sem esmorecer.

Ao meu esposo José Antônio, pela confiança, carinho e companheirismo dispensados nos momentos mais alegres e mais difíceis de nossas vidas.

Aos meus amados pais Felix e Delia, in memorian, pelo amor incondicional que sempre me dispensaram, dos quais me orgulho e sempre me lembro com um sorriso no rosto.

À minha amada mãe Maura pela vida, grande amor, dedicação e estímulo em todo momento, um presente de Deus na minha vida.

Ao meu pai Ismael, pelo exemplo de perseverança e de vida.

Às minhas amadas tias Eva e Betty, pelo amor e apoio através do tempo e da distância.

Aos meus queridos primos Gustavo, Martin, Carito, Emanuel e Gary, que são minha inspiração.

Ao anjo da minha vida, minha adorada Mel.

Ao meu sogro Carlos, in memoriam, o homem mais digno e bondoso que já conheci.

À minha sogra Hortência, cunhados e sobrinhos pela constante alegria e apoio.

A toda minha família... vocês são os pilares de minha vitória, os meus ombros consoladores e por isso dedico esta vitória a vocês.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof. Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon, orientadora deste estudo, competente e incansável, por todo o amparo pessoal e técnico, pelo acolhimento, paciência, amizade, apoio e confiança que me tem dispensado durante esta trajetória, pelas sábias palavras e ensinamentos que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Prof. Rubens Feferbaum, meu co-orientador, muito obrigada meu Professor, meu mestre, pelos ensinamentos, pela força, apoio e inspiração desde o início até o fim desta tese, A presente dissertação de doutorado não poderia chegar a bom porto sem seu precioso apoio. Muito obrigada por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho e obrigada por me ter corrigido quando necessário, sem nunca me desmotivar.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, criador de todas as coisas, pela saúde e por sempre me conduzir e sustentar em todas as fases de minha vida e por nunca me deixar só nos momentos de dificuldade e fraqueza.

Ao Prof. Werther Brunow de Carvalho, Professor Titular da Disciplina de Neonatologia e Cuidados Intensivos, pelas valiosas sugestões em relação a esta pesquisa.

À Dra. Cristina Erico, Chefe do Centro de Terapia Intensiva Neonatal 2, do Instituto da Criança e do Adolescente HC-FMUSP, pelo apoio incondicional, motivação, companheirismo e por me auxiliar em todas as fases desta pesquisa.

A toda a equipe médica do Centro de Terapia Intensiva Neonatal 2 do Instituto da Criança e do Adolescente HC - FMUSP, local do presente estudo, pelo apoio e ajuda na coleta de dados.

À minha amiga Angela Midori, Gerente de Enfermagem, pelo apoio incondicional e por me auxiliar na coleta de dados e a toda a equipe de enfermeiras, auxiliares e funcionários do Centro de Terapia Intensiva Neonatal 2 do Instituto da Criança e do Adolescente HC - FMUSP.

À Professora Carla Taddei, pela iniciativa, pela revisão do trabalho e pelo apoio contínuo.

Ao Doutor Ramón Cortez, pela inestimável assessoria estatística, na interpretação dos números e pelo apoio na análise e interpretação dos dados.

À Dra. Valdenise Tuma Kalil, pela amizade, incentivo e apoio, desde o início de minhas atividades profissionais.

Ao Dr. Daniel Katayama, professor e amigo que me deu grande apoio e incentivo desde o início da minha trajetória no Instituto da Criança.

Ao Dr. Toshio Matsumoto e a toda a equipe médica da UTI do Hospital Menino Jesus, por reforçar a importância deste projeto e me apoiar sempre.

À minha amiga, Mariza Kazue Umetzu Yoshikawa, pelo valioso auxílio nas referências bibliográficas e pelos conselhos em todas as fases desta pesquisa.

Ao Nivaldo e à Milene, pelas mensagens de apoio e amizade durante esta trajetória e pela ajuda imensa na reta final.

À Rosangela Fernandes de Souza, pela preciosa ajuda na formatação da tese.

À Alessandra Fernandes, pela revisão da Língua Portuguesa.

A todos os Professores das Disciplinas da Pós-graduação, pelos momentos de aprendizado e discussões técnico-científicas que muito enriqueceram meu conhecimento.

Ao Prof. José Lauro Araújo Ramos pelos ensinamentos, amizade, apoio e pela sua importância na formação de tantas gerações de pediatras. Sinto-me honrada de ter sido discípula deste ícone da Neonatologia Brasileira.

Ao Professor Clovis Artur Almeida da Silva, por sempre acreditar em mim e pelo carinho, amizade e apoio. Obrigada pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade.

À Dra. Eliana Zlochevsky e família pelo grande carinho e acolhimento, obrigada por ser minha segunda família e por estar ao meu lado sempre.

Agradeço aos funcionários das bibliotecas da Faculdade de Medicina da USP, que foram sempre prestativos, e pelos cursos de pesquisa, coleta de dados e formatação de dados.

Aos meus amigos, por acreditarem nos meus sonhos e sempre estarem dispostos a compartilhar ideias.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este estudo fosse realizado...muito obrigada!!!!!

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação: 2011.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO 1

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO..... 45

3. HIPÓTESE..... 47

4. OBJETIVOS..... 49

5. MÉTODOS..... 51

6. RESULTADOS..... 56

7. DISCUSSÃO..... 78

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 98

9. ANEXOS..... 100

10.REFERÊNCIAS..... 116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC= Ácidos graxos de cadeia curta

ARA= Ácido araquidônico

BLH= Banco de Leite Humano

DHA= Ácido docosahexaenóico

ECN= Enterocolite necrosante

EED= Disfunção entérica ambiental

ESPGHAN= European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition

FOS= Frutooligossacarídeos

GABA= Ácido gama-aminobutírico

GALT= Tecido linfoide associado ao tubo digestivo

GH/IGF-1= Fatores de crescimento semelhante a insulina

GI= Microbioma gastrointestinal

GMM= General Mixed Model

GOS= Galactooligossacarídeos

HCFMUSP= Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HMOs= Oligossacarídeos do leite humano

ICr= Instituto da Criança

IFNy= Interferon Gama

IgA= Imunoglobulina A

IgG= Imunoglobulina G

IgM= Imunoglobilina M

LCPUFAs= Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa

LGG= Lactobacillus GG

MFGM= Membrana do Glóbulo de Gordura do Leite

NPP= Nutrição parenteral prolongada

PCR= Proteína C reativa

PDX= Prebióticos polidextrose

PTI= Púrpura trombocitopênica imune

RN= Recém-nascido

RNMBPN= Recém-nascido com muito baixo peso ao nascimento

RNPT= Recém-nascido pré-termo

SNC= Sistema nervoso central

SNP= Sistema nervoso periférico

SPSS= Statistical Analysis Software versão 22

TGI= Trato gastrointestinal

UCI= Unidade de cuidado intensivo

USP= Universidade de São Paulo

UTI= Unidade de terapia intensiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma do acompanhamento dos RN..... 57

Figura 2- Gênero..... 59

Figura 3- Evolução do peso semanalmente para cada RN..... 61

Figura 4- Principais filos observados no período basal..... 62

Figura 5- Principais gêneros observados no período basal..... 65

Figura 6- Porcentagem do uso de antibióticos durante a internação em RN com defeito congênito de parede abdominal..... 66

Figura 7- Gêneros bacterianos com maior diferença de acordo com o uso de mais de três ciclos de antibióticos..... 70

Figura 8- Gêneros bacterianos com maior diferença de acordo com o uso de mais de três ciclos de antibióticos..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados gerais e clínicos..... 60

Tabela 2- Análise dos filos microbianos ao nascimento..... 62

Tabela 3- Análise dos gêneros microbianos no início da vida..... 64

Tabela 4- Análise dos filos de acordo com o uso de antibioticoterapia..... 67

Tabela 5- Análise dos gêneros de acordo com o uso de antibioticoterapia..... 69

Tabela 6- Filos bacterianos de acordo com a ocorrência de sepse durante a internação..... 71

Tabela 7- Gêneros bacterianos de acordo com a ocorrência de sepse durante a internação..... 73

Tabela 8- Correlação entre os filos bacterianos e o tempo de NPP (n=25)..... 74

Tabela 9- Correlação entre os gêneros bacterianos e o tempo de NPP (n=25)..... 75

Tabela 10- Correlação entre os filos bacterianos e o tempo de jejum (n=25)..... 76

Tabela 11- Correlação entre os gêneros bacterianos e o tempo de jejum (n=25)..... 77

Resumo

Vargas NSO. Caracterização do microbioma intestinal em recém nascidos com defeitos congênitos do trato gastrointestinal submetidos à correção cirúrgica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: O epitélio intestinal de recém-nascidos (RN) é uma superfície mucosa sensível e pode apresentar respostas inflamatórias exacerbadas tanto para bactérias comensais como patógenos. RN portadores de defeitos congênitos da parede abdominal e do abdome submetidos à correção cirúrgica e internados em Unidades de Cuidado Intensivo são mais susceptíveis a influências ambientais, com consequente desordem da microbiota intestinal é possível proliferação de bactérias patogênicas. **Justificativa**: Gastrosquise e onfalocele são condições relacionadas a defeito no fechamento da parede abdominal durante o desenvolvimento intra-útero. A dismotilidade intestinal ou íleo adinâmico no pós operatório são complicações frequentemente presentes nesses RNs, levando ao uso de nutrição parenteral por longos períodos e ao uso de antibióticos de amplo espectro, o que aumenta o risco de adquirirem sepse. **Hipótese**: Pouco se sabe sobre a composição da microbiota fecal de RN graves com alterações intestinais importantes como gastrosquise, onfalocele. **Objetivos**: Avaliar a evolução da composição da microbiota intestinal de recém-nascidos no pós operatório da cirurgia abdominal, internados em UTI neonatal, durante o período de internação e relacionar as eventuais intercorrências clínicas; avaliar a composição da microbiota fecal de crianças em jejum prolongado e em vigência de sepse neonatal. **Métodos**: Incluídos 30 RN com mal formaçoes da parede abdominal, os quais foram divididos em grupos de acordo com a má formação apresentada: gastrosquise (n=18), onfalocele (n=8) ou atresia/hérnia (n=4). Colhidas amostras de fezes sequencialmente, a cada sete dias, até a alta, imediatamente colocadas em refrigerador e transferidas em gelo para armazenamento em freezer -80°C. Sendo realizada a extração de DNA utilizando o kit QiaAmp DNA Stool (Qiagen), e armazenados a -20°C sendo realizado o sequenciamento e Análise de bioinformática, dessa forma, por comparação, foram identificados os filos e gêneros a que pertencem. **Resultados**: O filo mais abundante ao nascimento foi Firmicutes, o segundo Proteobacteria.O principal gênero ao nascimento na onfalocele e no grupo com atresia / hérnia foi Staphylococcus. O gênero mais abundante na gastrosquise foi Streptococcus. O filo Proteobacteria foi o mais abundante no grupo que

recebeu mais de 3 ciclos de antibióticos (66,63 ± 27,9) em comparação ao grupo que recebeu menos de 3 ciclos (57,48 ± 39,9). O filo Firmicutes apresentou-se mais abundante no grupo que recebeu menos de 3 ciclos (37,25 ± 36,5), em comparação ao grupo que recebeu mais de 3 ciclos (24,51 ± 22,5). O filo Bacteroidetes mais abundante no grupo que recebeu mais de 3 ciclos e Actinobacteria no grupo que recebeu menos de 3 ciclos. O gênero mais prevalente no grupo que recebeu mais de 3 ciclos de antibióticos foi Klebsiella (22,57 ± 23,9) e o mais prevalente no grupo que recebeu menos de 3 ciclos foi Escherichia-Shigella (20,89 ± 36,3). Outros gêneros abundantes no grupo que recebeu mais de 3 ciclos foram Serratia, Stenotrophomonas, e Veillonella. No grupo que recebeu menos de 3 ciclos, outros gêneros mais abundantes foram Streptococcus e Enterococcus. O único gênero que apresentou diferença estatística entre os grupos foi Prevotella, aumentado no grupo que recebeu mais de 3 ciclos. Com relação ao tempo de uso de NPP os filos com correlação positiva fraca foram Actinobacteria e Bacteroidetes. Os gêneros que apresentaram significância estatística no teste de correlação foram Lactobacillus (p=0,014) e Lachnospiraceae (p=0,05). A influência do tempo de jejum na microbiota intestinal mostrou o filo Bacteroidetes com uma tendência à correlação positiva fraca com o tempo de jejum (p=0,07). Os gêneros que apresentaram correlação positiva fraca com o tempo de jejum nesta análise foram: Odoribacter, Prevotella, Alistipes, Granulicatella e Lachnospiraceae; para o gênero Enterococcus observado uma correlação positiva média. **Discussão**: Os resultados obtidos poderão ser importantes para entender como se dá a colonização da microbiota intestinal na criança com malformaçoes da parede abdominal e suas possíveis consequências clínicas e as intervenções para melhorar a adaptação intestinal e qualidade de vida destes pacientes.

Descritores: Microbiota; Gastrosquise; Hérnia umbilical; Cirurgia; Trato gastrointestinal; Recém-nascido.

Abstract

Vargas NSO. *Characterization of the intestinal microbioma in newborns with congenital defects of the gastrointestinal tract submitted to surgical corrections* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Introduction: The intestinal epithelium of newborns (NB) is a sensitive mucosal surface and may present exacerbated inflammatory responses to both commensal bacteria and pathogens. NB with congenital defects of the abdominal wall and abdomen submitted to surgical correction and hospitalized in Intensive Care Units are more susceptible to environmental influences, with a consequent disorder of the intestinal microbiota and possible proliferation of pathogenic bacteria. **Justification**: Gastroschisis and omphalocele are conditions related to a defect in the closure of the abdominal wall during intrauterine development. Intestinal dysmotility or adynamic ileus in the postoperative period are complications frequently present in these NBs, leading to the use of parenteral nutrition for long periods and the use of broad-spectrum antibiotics, which increases the risk of acquiring sepsis. **Hypotheses**: Little is known about the composition of the fecal microbiota of critically ill newborns with important intestinal alterations such as gastroschisis and omphalocele. **Objectives**: To evaluate the evolution of the composition of the intestinal microbiota of newborns in the postoperative period of abdominal surgery, admitted to a neonatal ICU, during the period of hospitalization and to relate any clinical complications; to evaluate the composition of the fecal microbiota of children in prolonged fasting and in the presence of neonatal sepsis. **Methods**: 30 newborns with malformations of the abdominal wall were included, who were divided into groups according to the malformation presented: gastroschisis (n=18), omphalocele (n=8) or atresia/hernia (n=4). Stool samples were collected sequentially, every seven days, until discharge, immediately placed in a refrigerator and transferred on ice for storage in a -80°C freezer. DNA extraction was performed using the QiaAmp DNA Stool kit (Qiagen), and stored at -20°C, sequencing and bioinformatics analysis was performed. By comparison, the phyla and genre to which they belong were identified. **Results**: The most abundant phylum at birth was *Firmicutes*, the second being *Proteobacteria*. The main genres at birth in the omphalocele and atresia/hernia group was *Staphylococcus*. In gastroschisis *Streptococcus.* The *Proteobacteria* phylum was the most abundant in the group that received more than 3 cycles of antibiotics (66.63 ± 27.9). Firmicutes was more abundant in the group that received less than 3 cycles (37.25 ± 36.5), compared to the group that received more than 3 cycles (24.51 ± 22.5). The phylum *Bacteroidetes* abundant in the group that received more than 3 cycles and *Actinobacteria* in the group that received less than 3 cycles. The most prevalent genre in the group that received more than 3 cycles of

antibiotics was *Klebsiella* (22.57 ± 23.9) and in the group that received less than 3 cycles was *Escherichia-Shigella* (20.89 ± 36.3). Other abundant genres in the group that received more than 3 cycles were *Serratia, Stenotrophomonas*, and *Veillonella*. In the group that received less than 3 cycles were *Streptococcus* and *Enterococcus*. The only genre that showed a statistical difference was *Prevotella*, which increased in the group that received more than 3 cycles. Regarding the time of NPP use, the phylum with weak positive correlation were *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. The genres that showed statistical significance were *Lactobacillus* (p=0.014) and *Lachnospiraceae* (p=0.05). The influence of fasting time on the intestinal microbiota showed that the phylum *Bacteroidetes* tended to have a weak positive correlation with fasting time (p=0.07). The genera that showed a weak positive correlation with fasting time in this analysis were: *Odoribacter, Prevotella, Alistipes, Granulicatella* and *Lachnospiraceae;* for the genre *Enterococcus*, an average positive correlation was observed. **Discussion**: The results obtained may be important to understand how the colonization of the intestinal microbiota occurs in children with abdominal wall malformations and their possible clinical consequences and the interventions to improve the intestinal adaptation and quality of life of these patients

Descriptors: Microbiota; Gastroschisis; Hernia; umbilical; Surgery; Gastrointestinal tract; Newborns.

.

1.INTRODUÇÃO

Qual é o papel do microbioma intestinal? A saúde seria o resultado de um convívio pacífico do hospedeiro com esse microbioma intestinal, que inclui o processamento dos nutrientes, degradação dos xenobióticos, defesa imunitária, a regulação da barreira epitelial, metabolismo e crescimento; todos esses são efeitos que se devem aparentemente à microbiota intestinal. A microbiota e o trato intestinal agem em conjunto (Fiocchi; Souza, 2012; Eberl, 2010).

Existe a programação da saúde pelo microbioma gastrointestinal (GI) da mãe para o bebê no intraútero, mas o contato com o meio externo e com a mãe e também o aleitamento materno fazem com que a microbiota, em poucas semanas, torne-se igual à materna. Esse é o chamado período sensível (Dominguez-Bello et al., 2011; Rautava et al., 2012). Até a forma do parto tem sido valorizada nesse sentido, sendo o parto cesáreo associado a um maior risco de doenças atópicas e inflamatórias. O recém-nascido (RN) recebe, durante o parto cesáreo, exposição enorme de microrganismos da pele da mãe, enquanto no parto normal existe uma exposição a microrganismos diferentes. Durante a infância aumenta rapidamente a microbiota com uma diversidade de microrganismos e na idade adulta fica mais estável, sendo diferente em cada fase da vida. Há uma evolução temporal da microbiota GI humana do nascimento (período sensível) à idade adulta, modificada pelos alimentos e pelo meio ambiente (Dominguez-Bello et al., 2011). No intestino fetal, na membrana própria ou córion, há muito poucas células, mas depois do nascimento existe uma grande reprodução de células do tecido imunitário que compõem o maior tecido linfoide do organismo, o sistema imunitário da mucosa do trato gastrointestinal (TGI), onde também existe um mecanismo trófico que

será fundamental na função do TGI estimulado pela microbiota, estabelecendo a imunidade da mucosa do TGI, onde ocorre a integração das respostas adaptativa e imunitária, a resposta do sistema imune inato epitelial a antígenos microbianos (Maynard et al., 2012). Em situação de eubiose há predomínio de IgA secretora, plasmócitos e ativação de células T regulatórias; no entanto, em condições de disbiose ocorre o contrário, ou seja, estimulação de citocinas pró-inflamatórias. Hoje em dia se sabe que determinados microrganismos podem estimular respostas específicas: por exemplo, a *Listeria monocytogenes* induz uma resposta THU, enquanto *Citrobacter, Cândida* e *Escherichia coli* induzem uma resposta do tipo CH17 e por outro lado os *Bacteroides fragilis* e *Clostridium* tendem a estimular uma resposta T regulatória (inflamatória).

Segundo o conceito de multibioma não somente haveria a relação entre o hospedeiro e a microbiota, mas é importante também chamar atenção para as relações entre os diferentes grupos de microrganismos dentro dessa microbiota. Dentro da comunidade microbiana os componentes interagem entre si e a saúde seria uma resposta dessa integração dos microrganismos do multibioma com o corpo humano (Filyk; Osborne, 2016). A síntese de ácidos graxos de cadeia curta é realizada basicamente por bactérias comensais do intestino, atuando na regulação da resposta do sistema imunitário de forma muito importante, na proliferação celular e na apoptose, não somente como elementos essenciais para a nutrição do próprio epitélio intestinal. Semelhante é o que ocorre no metabolismo dos ácidos biliares no sistema êntero-hepático, metabolizados por bactérias comensais que atuam na regulação de uma série de respostas da linhagem macrófago-monocítica: há uma regulação de expressão gênica, da sepse como as citocinas e uma série de células do

sistema imunitário, tudo causado pela ação das bactérias sobre os ácidos biliares do ciclo êntero-hepático (Brestoff; Artis, 2013).

A programação do futuro das crianças se realiza nos primeiros mil dias, que se contam a partir da concepção até os dois anos de vida, período no qual se dá sua programação imunológica e metabólica. Por que é importante programar? Porque vivemos a pandemia das doenças crônicas não transmissíveis da infância: câncer, obesidade, stress, doenças inflamatórias intestinais, diabetes, autismo, alergias alimentares, asma. Existem fatores de risco para estas doenças, programados ainda na infância. É importante entender o conceito do microbioma para a prevenção; ele constitui a interação de microrganismos (compostos de bactérias, bacteriófagos, fungos, protozoários e vírus), dos elementos genômicos, dos metabólitos e dos produtos resultantes em um nicho ecológico, ou seja, todos esses microrganismos atuam em conjunto, dependem uns dos outros. Ao longo do tempo temos perdido a diversidade do microbioma; houve o empobrecimento do nosso microbioma, que é ponto fundamental neste contexto.

Fatores influenciadores da microbiota, além dos fatores genéticos – que a princípio são imutáveis – podem mudar a estrutura do DNA e perpetuar as doenças. Há alguns fatores ambientais muito importantes, por exemplo o aleitamento materno exclusivo e a troca do aleitamento por uma fórmula infantil; o tipo de parto, sendo cada vez mais prevalente o parto cirúrgico; uso de medicamentos de forma exagerada (fator acentuado pela pandemia da Covid-19, com o abuso dos medicamentos, muitas vezes desnecessários); a questão da participação materna, quer seja na sua dieta, quer seja no seu

estado emocional ou no uso de medicações, além da condição geográfica e emocional que vai afetar esta criança (Sharpnton et al., 2019).

O papel materno é muito importante, mesmo antes do nascimento. Durante a gestação a microbiota materna e a sua biodiversidade serão importantes, graças a uma dieta rica em fibras e probióticos, uma dieta que contenha alimentos funcionais, com os do tipo prebióticos e até mesmo os pós-bióticos, que seriam os produtos metabólicos desta interação simbiótica. Tal biodiversidade vai ser muito importante porque a microbiota materna já poderia, por um mecanismo de translocação de bactérias ou dos seus micro produtos, ganhar o espaço na corrente sanguínea, circulatória e linfática e chegar até os cenários placentários do líquido amniótico e por uma questão fisiológica ser deglutido esse líquido amniótico pelo feto, levando subprodutos dessa microbiota, até mesmo as próprias bactérias, e já ser um indicativo de uma colonização fetal. São estudos ainda controversos, mas temos com certeza a presença desses micro produtos encontrados no nível do intestino fetal e algum tipo de microrganismos, que entretanto já podem começar a estimular o sistema imunológico e o sistema metabólico, por exemplo com a produção de células T reguladoras, ou produzir ácidos graxos de cadeia curta e a estimulação humoral a partir da síntese de imunoglobulina A (IgA) secretora.

O desenvolvimento morfofuncional do sistema imunológico ainda é muito incipiente, à medida em que há uma proliferação microbiana marcante, que acontece já nas primeiras horas de vida, sobretudo com o aleitamento materno exclusivo ou através do parto vaginal, condições básicas para uma boa instalação microbiana. Na proliferação de células imunológicas, de Linfócitos B produtores de IgA secretora, Linfócitos T do tipo reguladores que são

fundamentais em uma imunomodulação e estimulação de células de Paneth, além de todo um contexto morfofisiológico do intestino, que vai acontecer graças a uma colonização adequada. Estudos mostram o oposto: um animal isento de microbiota vai ter toda uma disruptura imunológica, levando a uma condição muitas vezes incompatível com a vida. Os linfócitos T reguladores vão ter um papel fundamental na formação do microbioma.

Tudo isso começa ainda intraútero e do ponto de vista imunológico, a resposta Th2 linfocitária, que é um sub perfil dos linfócitos muito conhecido por ser responsável pelos fenômenos alérgicos, mas que na gravidez é responsável pela questão da manutenção do feto dentro do ventre materno. Se este perfil Th2 se mantiver alto após o nascimento poderia favorecer o desenvolvimento de doenças Th2 dependentes, no caso doenças alérgicas, então é necessário após o nascimento a diminuição do perfil Th2 e aumento do perfil Th1; esse desequilíbrio fisiológico é necessário que aconteça do ponto vista imunológico e quem mantém esse desbalanço adequadamente são as células T reguladoras, por isso é muito importante que elas sejam expressas e ativas logo após o nascimento. O papel da microbiota nesse sentido é fundamental, pois caso esse perfil Th2 se mantenha alterado teríamos o aparecimento de doenças alérgicas, doenças de intolerância desde o ponto de vista farmacológico. A programação imunometabólica é fundamental e a microbiota bem instalada faz parte dessa programação desde o pré-natal e passando para o pós-natal. No pós-natal muitos são os fatores que vão estar envolvidos nessa programação, como a questão da família numerosa ou não, a presença de infecções parasitárias, o tipo de dieta, o tipo de clima onde o paciente vive, a geografia, a questão da higiene ambiental, o tipo de proteínas

que está em contato no meio ambiente ou na dieta, a presença de fumantes no ambiente e assim por diante.

Microbioma no início da vida e colonização do RN**:** Placenta, Líquido Amniótico e Mecônio – DNA bacteriano: colonização na vida intrauterina.

- Membros do microbioma materno translocados para o feto via corrente sanguínea.
- Bactérias iniciais no intestino modulam a expressão gênica do epitélio com consequências para toda a vida.
- Parto - carga bacteriana recebida tem impacto no microbioma intestinal.
- Outros fatores que interferem na formação da microbiota: O peso materno também pode afetar a composição do leite materno. Mães obesas têm maior quantidade de *Staphylococcus* e *Lactobacillus* e menor quantidade de *Bifidobacterium* no leite materno. A dieta materna rica em gordura também modifica a colonização bacteriana desta mãe e consequentemente da criança.
- Dados de experimentos com animais também mostraram que uma dieta rica em gordura durante a gestação e no período pósdesmame causava disbiose intestinal significativa no início da vida (Kapourchali; Cresci, 2020; Milani et al., 2017; McKeen et al., 2019). Um estudo que mostra a mudança do microbioma do leite materno de acordo com o peso da mãe foi realizado por Cabrera et al. em 2012, quando foram analisadas 2623 amostras de Leite Materno: Colostro, leite de 1 mês e de 6 meses. Utilizada a técnica de Proteína C reativa (PCR), com leite de 18 mulheres, sendo 10

obesas. O leite materno das mães obesas mostrou menor diversidade da microbiota, menor quantidade de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e maior quantidade de *Staphylococcus.* Mostrou-se também a transferência de microbiota aberrante durante o estabelecimento inicial da criança.

A colonização precoce em RN saudáveis acontece no início da vida: Existe a presença basicamente das *bifidobactérias* e *lactobacilos*, que contribuem no processo imunológico para as respostas naturais e adquiridas. A microbiota intestinal auxilia na síntese e absorção de nutrientes essenciais. Gera produção de AGCC que servem como uma fonte de energia para os colonócitos. Ajuda na manutenção da barreira da mucosa intestinal (com a produção de proteínas que fazem parte das Tight Junction). Participa da produção de citocinas anti-inflamatórias e influência no crescimento infantil. A disbiose precoce tem sido associada à enterocolite necrosante, bem como a algumas doenças crônicas, como obesidade, diabetes, doença inflamatória intestinal, câncer, alergias, asma e até doenças neurológicas associadas ao eixo intestino-cérebro (Thursby; Juge, 2017; Kapourchali; Cresci, 2020).

Existe uma verdadeira transferência materno-fetal da microbiota. A maioria dos estudos da microbiota intestinal falam que o ambiente intrauterino é estéril e que a colonização acontece no momento do parto, mas alguns autores vêm trazendo informações, principalmente relacionadas à extração do DNA, onde a identificação de material genético das bactérias mostra que possivelmente existe uma transmissão dessa microbiota da mãe para o filho, o que vai gerar um status de microbiota saudável ou um status de microbiota disbiótica, principalmente naqueles RN prematuros e de baixo peso

(Kapourchali; Cresci, 2020; Millani et al., 2017; McKeen et al., 2019). Sabemos que DNA de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram detectados no líquido amniótico, na placenta principalmente, o que sugere uma translocação bacteriana do intestino materno para a placenta. Alguns estudos recentes questionam metodologia, a forma da extração, a forma em que foi coletado o material, mas as evidências de alguns estudos isolados nos fazem refletir que faltam mais estudos para agregar essa informação de que o ambiente intrauterino não é estéril. Outra referência à similaridade entre a microbiota da cavidade oral da mãe e a microbiota encontrada no nível intrauterino e no nível de líquido amniótico, é encontrada nos experimentos em animais que também mostram essa similaridade entre a placenta e o mecônio do RN em relação à microbiota da cavidade oral da mãe e foram encontrados também tanto receptores de AGCC como os próprios ácidos graxos de cadeia curta, presentes na placenta do feto, mostrando que possivelmente existe uma microbiota ali; além disso, os estudos de transferência de *Bifidobactérias,* no nível da microbiota mostram que diminui progressivamente a sua população na idade adulta. Os adultos se mantêm com nível mínimo, que é transferido para gerações. Existe uma diversificação importante na microbiota do bebê e vai haver vários fatores influenciando a cavidade oral, antes do parto e no pós-parto, mas o trato gastrointestinal era pouco diversificado no pós-parto, tendo *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobactérias* e um pouco de *Actinobactérias*, o que posteriormente vai se diversificar ainda mais, a depender da exposição e de outros fatores que interferem na formação da microbiota dessa criança como a microbiota da pele materna, a microbiota intestinal materna, o tipo de alimentação, as condições maternas, obesidade, os dados alimentares da mãe,

exposição à poluição, stress, idade gestacional, o tipo de parto e a microbiota vaginal da mãe (Millani et al., 2017). Em relação ao tipo de parto temos vários estudos mostrando que isto faz uma diferença significativa na composição da microbiota: sabemos que as crianças que nascem de parto vaginal são colonizadas basicamente por *Lactobacillus* e a colonização vem da pele da mãe, do intestino materno e do canal vaginal, o que gera uma microbiota relativamente normal, com produção de citocinas específicas para o desenvolvimento imunológico; já no caso do parto cesáreo essa microbiota é composta basicamente de *Staphylococcus* (da pele) e outras bactérias que não fazem parte da flora do bebê que nasce de parto vaginal, fazendo com que tenha uma microbiota anormal ou disbiótica que vai aumentar o risco de doenças crônicas e inflamatórias, como a obesidade, e que se associada a uma alimentação sem o aleitamento materno vai aumentar esse risco (Richardson et al., 2013). O parto cesáreo causa uma redução na resposta imune adaptativa, diminui os níveis de Imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, principalmente IgA, que é muito importante nesta fase (fator de defesa da criança), diminui os níveis de Interleucina 8, CD4, interferon Gama (IFNy) e aumenta o risco de atopias, artrite reumatoide e doenças inflamatórias intestinais de modo geral (Niemarkt et al., 2014; Seveisted et al., 2015).

A idade gestacional ao nascimento interfere também no tipo de microbioma: os prematuros têm imaturidade do sistema digestório, hospitalização prolongada, uso de antibióticos e ausência de aleitamento materno nos primeiros dias de vida. Esta microbiota tem alteração tanto na composição (pouco diversificada) quanto na sua funcionalidade. A colonização também é retardada em relação aos micróbios anaeróbios comensais. Há uma

redução de *Bifidobactérias, Bacteroides* e aumento dos *Enterococcus* e outros microrganismos patogênicos. As bactérias gram-positivas como *Staphylococcus*, *Enterococcus* e o próprio *Clostridium*, dominam a microbiota intestinal de prematuros durante o primeiro mês de vida, o que aumenta o risco para Enterocolite e Sepse Neonatal. Os prematuros também têm níveis reduzidos de AGCC, por conta da população de bactérias que predominam nessa microbiota e as vias metabólicas também são afetadas pois são influenciáveis por esta microbiota intestinal. O RN prematuro apresenta maior frequência de genes relacionados à biodegradação, metabolismo xenobiótico e metabolismo lipídico e menor frequência de genes relacionados ao metabolismo energético e à biossíntese de cofatores e vitaminas (Kapourchali; Cresci, 2020; Millani et al., 2017; Madan et al., 2012).

Recém-nascidos, especialmente os prematuros, são altamente susceptíveis a alterações do ambiente intestinal por apresentarem uma superfície mucosa intestinal particularmente sensível diante de células imaturas do epitélio intestinal e podem apresentar respostas inflamatórias exacerbadas tanto para bactérias simbiontes como patógenos. Neste contexto, a interação com microrganismos é delicada e é possível que se estabeleça tanto uma microbiota estável como uma situação de desequilíbrio, ocasionando a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (Fanaro, 2013; Gorkiewic; Moschen, 2018).

Eixo Cérebro-Intestino-Microbiota na Prematuridade

Evidências estão surgindo em relação à influência da composição da microbiota intestinal e o seu funcionamento na saúde do hospedeiro desde os primeiros estágios da vida. O desenvolvimento do microbioma é condicionado por vários fatores em bebês, peculiarmente em prematuros. Esta população está particularmente exposta a um alto risco de infecção, com subsequente tratamento antibiótico pós-natal, dificuldades de alimentação e deficiências de desenvolvimento neurológico. Até o momento, ainda existe uma ampla lacuna na compreensão de todos os determinantes e o mecanismo por trás da ruptura da microbiota e sua influência no desenvolvimento das complicações mais comuns dos prematuros. Grandes evidências surgiram durante as últimas décadas, mostrando a existência de um eixo de comunicação bidirecional envolvendo a microbiota intestinal, o intestino e o cérebro, definido como eixo microbiota-intestino-cérebro. Neste contexto, visto que existem poucos dados disponíveis para demonstrar a correlação entre disbiose da microbiota e distúrbios do neurodesenvolvimento em prematuros, o interesse crescente tem surgido para entender melhor o impacto do eixo microbiota-intestino-cérebro nos resultados clínicos de prematuros e esclarecer como isso pode levar a estratégias preventivas, diagnósticas e terapêuticas alternativas. Bresesti et al. (2022) fizeram uma revisão, na qual exploraram as evidências atuais sobre o desenvolvimento da microbiota em prematuros, com foco nos efeitos do tipo de parto, tipo de alimentação, fatores ambientais e possível influência do eixo microbiota-intestino-cérebro nos desfechos clínicos de prematuros durante sua hospitalização e sobre o seu estado de saúde mais tarde na vida. A

enterocolite necrosante (ECN) é uma doença relativamente comum em RN de muito baixo peso e está associada à alta mortalidade e morbidade. Nos sobreviventes, o comprometimento do neurodesenvolvimento é frequentemente observado. A etiologia exata permanece em grande parte a ser elucidada, mas a microbiota é considerada como tendo um papel importante no desenvolvimento da ECN. Além disso, existem evidências emergentes de que a microbiota também é de grande importância na função cerebral e no desenvolvimento. Portanto, a caracterização da microbiota tem potencial não só como ferramenta diagnóstica ou mesmo preventiva para prever ECN, mas poderia também servir como um biomarcador para monitorar e possivelmente até mesmo como um alvo para manipular o desenvolvimento do cérebro. Análise de fezes e dos compostos orgânicos voláteis que refletem a função da microbiota e a interação com o hospedeiro, tem se mostrado de interesse no diagnóstico de ECN e sepse tardia. Niemark et al. (2019) fizeram uma revisão, discutindo evidências do papel da interação complexa entre microbiota, ECN e desenvolvimento do cérebro, incluindo o eixo cérebro-intestino em bebês prematuros.

Os bebês prematuros correm um risco substancial de sofrerem lesões perinatais na substância branca. Embora a microbiota intestinal tenha sido implicada no desenvolvimento no início da vida, falta uma compreensão detalhada do eixo intestino-microbiota-imune-cérebro em RN prematuros. Seki et al. (2021) traçaram o perfil da microbiota intestinal, imunológica e o desenvolvimento neurofisiológico de 60 prematuros extremos, que receberam cuidados hospitalares padrão, incluindo antibióticos e probióticos. Descobriram que a maturação da atividade eletrocortical é suprimida em crianças com danos

cerebrais graves. Isso é acompanhado por níveis elevados de células T, aumento do fator de crescimento endotelial vascular e redução de neuroprotetores. O crescimento excessivo de *Klebsiella* no intestino é altamente preditivo de dano cerebral e está associado a um estado imunológico pró-inflamatório. Esses resultados sugerem que o desenvolvimento aberrante do eixo intestino-microbiota-imuno-cérebro pode conduzir ou exacerbar a lesão cerebral em RN prematuros extremos e representa um alvo promissor para novas estratégias de intervenção. Seki et al. (2021) realizaram uma análise do microbioma, estudando o eixo microbiota-imune-cérebro em bebês extremamente prematuros. Essa análise relaciona o microbioma do início da vida ao estabelecimento de imunologia e desenvolvimento neurológico, identificando biomarcadores do cérebro perinatal, lesões e alvos promissores para tratamentos personalizados para aliviar, ou até mesmo prevenir, doenças neurológicas ao longo da vida e morbidades.

O leite humano tem um papel protetor: O tipo de alimentação também interfere bastante. Sabemos que crianças amamentadas ao seio têm maior produção de *bifidobacteria* e crianças em aleitamento misto têm *bifidobactérias* e *bacteroides*. O trabalho de Hamsen et al. (2000) mostrou nas fezes de crianças em aleitamento materno exclusivo *bifidobactérias* e observamos em crianças em uso de fórmulas *Bifidobactérias, Bacteroides* e um pouco de *Clostridium*, estando as *bifidobactérias* em quantidades menores do que em crianças amamentadas ao seio.

Aleitamento materno e microbiota intestinal: O aleitamento materno é extremamente importante, pois temos o desenvolvimento da chamada “microbiota orientada para o leite”, que possui vários componentes que

facilitam o desenvolvimento dessa microbiota saudável, bem como os HMOs, que são os oligossacarídeos do leite humano que podem moldar seletivamente o crescimento e a função dessa microbiota. Tem-se ainda bactérias que são específicas e que conseguem metabolizar todas essas combinações de HMOs, gerando produção de AGCC e metabólitos que vão influenciar direta e indiretamente em nosso sistema imunológico. Então, nessas crianças em aleitamento materno, temos maior diversidade e funcionalidade da microbiota. O fenômeno de sucessão bacteriana continua, a microbiota vai se modificando e a criança com seis meses de idade vai receber alimentação complementar; com alimentação mais diversificada, onde predominarão mais bactérias que vão digerir amidos e polissacarídeos, essa sucessão começa a acontecer e vai se modulando antes da alimentação complementar. A transferência bacteriana de mãe para bebê ocorre através do leite materno (McKeen et al., 2019).

A função dos HMOs do leite materno: 1) Manter a integridade da barreira intestinal. 2) Auxiliar na produção de muco. 3) Proteção contra infecções. 4) Variação da comunidade bacteriana. 4) Produção de AGCCs e 5) Síntese de vitaminas (McKeen et al., 2019). Os probióticos do leite humano vão agir diretamente nas bactérias comensais ou nos patógenos, ou aumentando a produção de muco ou ativando através da modulação dessa microbiota as células dendríticas, favorecendo a maturação desse sistema imunológico inicial, que era inespecífica, para ser mais especializado na produção de anticorpos e com resposta mais direcionada para a tolerância imunológica.

Nutrição, cérebro e microbiota: em seu papel na nutrição, o leite materno leva a saúde ao bebê. Nessa janela inicial de colonização adequada o leite materno tem a composição própria adequada para levar a saúde ao

intestino, e leva também, por uma série de mecanismos, a uma maior inteligência do indivíduo. Deve-se atentar à realização de intervenções durante as janelas temporais críticas de desenvolvimento (Rodriguez et al., 2015). O leite materno é o melhor alimento para os lactentes; crianças que são amamentadas por períodos mais longos têm menor morbidade e mortalidade infecciosas, menos má oclusão dentária e maior inteligência do que aquelas que são amamentadas por períodos mais curtos ou não são amamentadas (Neville et al., 2012; Linch et al., 2016). Outros autores como Victora et al. (2015), pesquisadores da Universidade de Pelotas, no Brasil, que acompanharam 3.500 RN durante mais de três décadas, fizeram um estudo prospectivo de coorte e segundo a publicação uma criança amamentada por pelo menos um ano obteve, aos trinta anos, quatro pontos a mais de QI e acréscimo de 349 reais na renda média. Estudaram a associação entre aleitamento materno e inteligência, revelando que se os efeitos imediatos da amamentação sobre a saúde e o desenvolvimento dos bebês já é reconhecido, oferecendo proteção a doenças como diarreia, infecções respiratórias e alergias, além de reduzir o risco de hipertensão, colesterol alto, diabetes e obesidade, os impactos em longo prazo mostraram que os que foram amamentados ao seio tinham maiores escores de inteligência e menos doenças metabólicas.

Ao se falar em leite materno, é fundamental entender a complexidade dos componentes do leite materno e seus efeitos, pois a correta proporção de nutrientes essenciais no leite materno: 1) Proporciona a energia necessária para suas atividades, 2) Tem uma função estrutural e 3) Tem uma Atividade Funcional através dos seus Bicomponentes, pela presença de proteínas,

carboidratos e complexos lipídicos bioativos que podem ser determinantes para a qualidade de vida (Neville et al., 2012).

Os componentes bioativos do leite materno são:

1) Lipídios: ácido araquidônico (ARA), ácido docosahexaenóico (DHA), Fosfolípides, Gangliosídeos, Esfingomielina;
2) Proteínas: Imunoglobulinas, K-Caseína, Lactoferrina, Lactoaderina;
3) Lisozimas, Hormônios, Mucina, Alfa-Lactoglobulina, Citocinas;
4) Carboidratos: Lactose, Oligossacarídeos e Probióticos.

Os componentes do leite materno que impactam o neurodesenvolvimento:

1) **Membrana do Glóbulo de Gordura do Leite (MFGM):**

- Ação direta da estrutura e funcionalidade cerebral;
- Ação indireta via microbiota.

2) **Probióticos, carboidratos e prebióticos do leite materno.**

- Ação indireta via microbiota.

Estes são os compostos bioativos que produzem a modulação eixo cérebro-intestino-microbiota.

O que é a Membrana do Glóbulo de Gordura do Leite (MFGM)?

O MFGM se forma dentro de uma célula epitelial mamária. É uma membrana tripla que envolve os glóbulos de gordura do leite materno e é secretada através de um processo que ocorre em todos os mamíferos.

- Toda a gordura do leite se origina como pequenas gotas no interior das células epiteliais mamárias. Os triglicérides brotam como gotículas lipídicas do Retículo Endotelial e caem no citoplasma envolvidas por uma **monocamada fosfolipídica.**

- À medida que os glóbulos de gordura são liberados da célula (através de extrusão pela membrana apical), eles são envoltos por **uma camada DUPLA de membrana plasmática.**
- Como resultado, ao ser secretado, o glóbulo de gordura é envolto por uma membrana TRIPLA: a membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM) (Calil; Falcão, 2003).
- A MFGM não é apenas um simples ingrediente: é um composto de proteínas, lipídeos e carboidratos, incluindo: Gangliosídeos, Fosfolipídios, Esfingolipídios e Glicoproteínas. De 15 a 20% do total de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFAs) no leite estão nos fosfolipídios da MFGM (Epifanio, 2017).

As Glicoproteínas da MFGM atuam na modulação da microbiota:

Atividade bactericida:

- Glicoproteínas e/ou gangliosídeos da MFGM podem evitar que patógenos se liguem às superfícies da mucosa.
- Glicoproteínas, como a lisozima, podem destruir diretamente as bactérias rompendo as suas paredes celulares (atividade bactericida).

Atividade prebiótica:

- As glicoproteínas encontradas na MFGM resistem à digestão e são liberadas intactas no intestino.
- Essas glicoproteínas são fonte de nutrição para estimular o crescimento de bactérias benéficas na microbiota intestinal (Li et al., 2019).

- Existem evidências de que a MFGM pode alterar a composição da microbiota intestinal, aumentando os níveis das bactérias benéficas e reduzindo os níveis de bactérias nocivas (Ácido Siálico nos gangliosídeos).
- O trabalho de Li et al. (2019) mostrou menos diarreia e infecções do trato respiratório no grupo MFGM + LF aos 12 meses.

Lactentes amamentados ao seio têm perfil de bactérias diferente dos alimentados com fórmula: Os lactentes amamentados ao seio apresentam população com menor diversidade de bactérias intestinais e tem mais bactérias bífidogênicas e *lactobacilos* que lactentes alimentados com fórmula. Bactérias bífidogênicas são consideradas importantes para o desenvolvimento de uma microbiota saudável e desempenham um papel importante na maturação do sistema imune. A maior prevalência de *bifidobactérias* na microbiota associa-se ao reduzido risco de infecções do trato respiratório.

Lactentes alimentados com fórmula: Tem *bacteroides*, *Clostridium* e *enterobacteriaceae* em maior quantidade, ou seja, uma diversidade mais alta.

Prebióticos do leite humano: São ingredientes alimentares não digeríveis que afetam beneficamente o hospedeiro por estimularem seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um número limitado de espécies bacterianas já estabelecidas no colón, e, assim, melhorar a saúde do hospedeiro. Fornecem alimento para o microbioma. Fibras da dieta não digeríveis, estão presentes no leite humano como oligossacarídeos HMOs e podem ser adicionados às fórmulas infantis como galactooligossacarídeos (GOS), frutooligossacarídeos (FOS), prebióticos polidextrose (PDX) e HMOs,

sintéticos entre outros. Estimulam o crescimento e a atividade das bactérias benéficas no intestino.

Probióticos do leite humano: São microrganismos vivos que**,** quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam um benefício de saúde ao hospedeiro. Após serem ingeridas, estas bactérias poderiam compor parte do microbioma. As espécies encontradas no leite humano são os *estafilococos, estreptococos, lactobacilos* e *bactérias bífidogênicas*. Podem ser adicionadas às fórmulas infantis (exemplo: Lactobacillus GG (LGG)). Influenciam a microbiota no intestino do lactente.

Oligossacarídeos do leite humano (HMO): carboidratos complexos não digeríveis que, quando seletivamente fermentados, podem originar alterações específicas na composição da microbiota intestinal, conferindo benefícios ao indivíduo (efeito prebiótico). É o terceiro componente mais abundante no leite materno, contendo mais de 200 HMOs diferentes (Lyons et al., 2020).

Microbioma do Leite Materno

A arquitetura do Epitélio Intestinal é constituída por:

- Camada de muco, células epiteliais e lâmina própria, exercendo efeito barreira.
- Gel de muco, predominantemente Mucinas.
- Células Epiteliais revestidas por gel de muco.
- Microbiota ou microbioma composto por Bactérias distribuídas na camada exterior do muco.

- Células epiteliais + muco + microbiota + lâmina própria = BARREIRA INTESTINAL.

Colostroterapia: Tem início nas primeiras 24 horas de vida, com 0.2 ml de colostro ou 7 gotas em cada canto da boca, administrados em dois minutos, de duas em duas horas, por 3 dias.

Alimentação complementar: ocorre um consumo maior de polissacarídeos não amiláceos e amidos resistentes, cuja carência vai ser suprida por essa microbiota, que por sua vez vai produzir e digerir AGCC a partir desta alimentação.

Os AGCC acetato e butirato têm múltiplas funções e são produzidos por essa microbiota intestinal: 1) Estimulam os enterócitos e produzem peptídeos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas. 2) Regulam a diferenciação de linfócitos e recrutamento das células do sistema imune. 3) Diminuem a atividade das citocinas inflamatórias como TNF-Alfa e IL-12. 4) Estimulam a atividade dos neutrófilos, dos macrófagos e células dendríticas. 5) Aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-18.

O aleitamento materno, condição básica para nós pediatras, conforme determinado pela Sociedade de Pediatria e outras sociedades deve manter-se exclusivo por até seis meses e ser prorrogado até o segundo ano de vida ou mais.

O aleitamento materno mais uma vez é fundamental para o desenvolvimento imunológico e metabólico dessas crianças: desde o ponto de vista imunológico, as células que vão ser oriundas do tecido linfoide associadas ao intestino e também associadas a outras mucosas, no caso por exemplo das células B produtoras de IgA secretora, células B produtoras de IgG e linfócitos

T, células que vão passar ao leite materno de uma maneira íntegra, bem como células linfocitárias e os Ac que produzem (Wang et al., 2020).

No cenário do próprio bebê, ou do próprio lactente, seus imunógenos presentes no trato gastrointestinal alto e baixo, vão ser reconhecidos e vão ser direcionados para o fluxo retrógrado pelo ducto mamário para o tecido mamário materno e aí sim vão ser reconhecidos por células imunocompetentes, as quais vão produzir Ac específicos, fazendo parte da colonização do próprio lactente e constituindo uma resposta de proteção específica fornecida pelo leite materno. Uma programação imunológica realizada pelo processo de amamentação seria produzida pelos linfócitos presentes no tecido linfoide associado às mucosas que estão na glândula mamária, que vão passar diretamente ao leite materno e vão chegar ao trato digestório alto do lactente, passando pelo intestino e chegando até os tecidos corporais, onde exercem seu papel imunitário. Qual seria esse papel imunitário? 1) Uma modulação, uma resposta da célula T; 2) Uma possível influência dessa célula T baseada no repertório materno; 3) Apoio da imunidade intestinal neonatal na defesa e manutenção da homeostase intestinal; 4) Influência na resposta imune humoral e de imunotolerância e 5) Uma suplementação na produção neonatal de IgA secretora. O cenário imunológico é muito rico a partir do aleitamento materno exclusivo, que é um alimento gratuito e completo e do ponto de vista imunológico não tem comparação com qualquer outro tipo de alimento que não seja natural (Wang et al., 2020).

Na impossibilidade de aleitamento materno exclusivo e na possibilidade de ter que introduzir alimentação artificial ou complementar, a recomendação seria o uso de fórmulas infantis adequadas para idade daquele bebê. Mas por

que não usar o leite de vaca? Porque tem baixo teor de ácido linoleico e linolênico por exemplo, carboidratos em quantidades insuficientes, excesso de proteínas, alguns minerais em quantidades desbalanceadas, quantidades inferiores de Ferro, quantidades muito aumentadas de Sódio, Fósforo, cloretos e Potássio no leite, quantidades reduzidas de vitaminas C, D e E, Niacina e de vários outros oligoelementos como Zinco, Selênio e Cobre (Codex Alimentarius Comission – Fao E OMS, 2020).

As fórmulas infantis agregaram em sua composição alguns elementos da família dos bióticos, que aí seriam a presença de prebióticos e probióticos na sua correlação com os simbióticos e na sua produção os pós-bióticos.

O consenso da Organização Mundial de Gastroenterologia, em 2017, definiu como prebióticos os substratos que são utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros daquele indivíduo, conferindo então benefício para a sua saúde (World Gastroenterology Organisation, 2017). Esse substrato prebiótico, que pode vir na dieta ou pode vir associado à fórmula infantil, vai ser fundamental para a programação imunológica ou metabólica na ausência ou indisponibilidade do leite materno exclusivo. O substrato prebiótico tem várias fontes, mas o padrão ouro são os oligossacarídeos do leite materno. O poder bifidogênico do leite materno é indiscutível. Para uma microbiota equilibrada é preciso dar substrato do leite materno, pois os oligossacarídeos do leite materno têm sua proporção de ácidos graxos ideais. De acordo com o consenso do European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) de 2011 sobre prebióticos, a mistura específica de 90% de GOS e 10% de FOS, com respaldo na sua segurança e benefícios, é a 9:1 na concentração de 0.8 gr/100mL (Braegger et al., 2011).

Metabolismo dos prebióticos: esse substrato prebiótico vai ser fundamental pois faz parte de um complexo metabolismo, ou seja, a partir da fermentação desse substrato por essas bactérias que estão numa diversidade adequada temos a geração de produtos intermediários como ácido succínico, ácido lático e etanol; produtos mais definitivos, como os ácidos graxos de cadeia curta, tais como o ácido propiônico, o ácido acético e o ácido butírico, considerados como padrão ouro dessa interação pré e probióticos, gerando os pós-bióticos na execução da sua função. Recentemente saiu uma revisão, realizada na Finlândia e na Polônia, onde fizeram uma compilação da família dos bióticos, destacando a função na melhora da consistência das fezes e na frequência das evacuações, o que é fundamental no contexto de prebióticos no leite materno, que vão produzir uma maior retenção de água na luz intestinal e amolecimento das fezes, diminuindo o tempo da digestão, fornecendo, enfim, um hábito intestinal saudável para essa criança. Há uma resposta imunológica direta reduzindo infecções pela ação prebiótica.

Os efeitos clínicos e de segurança da família dos bióticos: 1) Aumento dos níveis de bifidobactérias; 2) Reduzir o risco de manifestações alérgicas; 3) Efeitos imunitários sistêmicos diretos, como reduzir o risco de infecções; 4) Melhora do hábito intestinal; 5) Reduzir a patogenicidade das bactérias intestinais.

Na programação imunológica chama a atenção a questão da expressão das proteínas de junção ao nível intestinal. Hoje em dia é muito conhecida a Síndrome de Leaky Gut, em que o intestino fica mais frágil, ou seja, mais permeável, o que se deve à fragilidade dessas proteínas de junção que estão presentes entre as células epiteliais intestinais e a questão da utilização dos

probióticos e os seus subprodutos, no caso os ácidos graxos de cadeia curta, diretamente relacionados à questão dessa melhor oclusão intestinal e que vão mantendo as funções firmes e aumentando a produção de oclutinas e clautinas, fazendo com que essas funções permaneçam intactas, reduzindo o processo de translocação bacteriana e translocação antigênica, evitando inflamação, infecção ou processo de hipersensibilidade. Nosso objetivo seria evitar essa disruptura, essa situação de intestino frágil de Leaky Gut, e evitar que aconteça uma situação de DISBIOSE, através da oferta de um aleitamento materno exclusivo, que vai propiciar uma situação de EUBIOSE e que, assim sendo, todas as repercussões de programação imunológica possam acontecer. Nesse contexto metabólico se destaca a participação dos ácidos graxos de cadeia curta voltada ao controle ponderal; o controle da obesidade, hoje em dia, se faz desde os primeiros momentos de vida, então devemos pensar na programação nos primeiros mil dias de vida como um fator importante. Existe um contexto dos ácidos graxos de cadeia curta que são produzidos por meio de uma microbiota bem instalada, associados a um substrato adequado (prebióticos e probióticos por exemplo). A partir deste momento em que temos os ácidos graxos produzidos teremos seu metabolismo ativo, havendo uma menor resistência insulínica, favorecendo então o processo de menor síndrome metabólica. Alguns desses elementos, como butiratos, permanecem na luz intestinal, mas ao final do intestino serão unidos com as proteínas integrativas, como JPR 41 e 43, muito importantes para a atividade simpática a nível intestinal, levando esta informação para o sistema nervoso central (SNC) através do eixo intestino–cérebro, o que nos dá a sensação de saciedade através da liberação de hormônios sacietógenos, mais um indicativo no

controle da obesidade que culmina com uma menor resposta inflamatória, aumento de leptina, de remissão da lipólise e equilíbrio da lipogênese. Nesse contexto metabólico inflamatório é muito importante que tenhamos em mente que pode haver uma programação e adequação de acordo com o tipo de alimentação ou tipo de substrato que será ofertado para essa criança desde a gestação, passando pelos mil dias de vida que auxiliam no desenvolvimento da microbiota saudável.

Formação do Microbioma

O sistema do microbioma intestinal é complexo, diversificado e populoso: sabemos que tem cerca de dez milhões de células (23000 genes) e cem trilhões de bactérias (33 milhões de genes), ou seja, temos mais genes de bactérias do que genes de células humanas interagindo com os nossos genes e causando modificações epigenéticas que vão repercutir na vida adulta. A formação desse microbioma, portanto, é extremamente importante para a prevenção de doenças crônicas no futuro e também na manutenção da saúde; 70% dessa microbiota está localizada no intestino (nosso principal órgão imunológico) e à medida que vamos descendo no trato gastrointestinal, a composição é maior no cólon, com maior diversificação também (Vyas; Ranganathan, 2012). Os principais colonizadores, de acordo a localização, são os *lactobacilos* e *bifidobactérias*, mas temos, no cólon, uma diversidade de bactérias como *bacteroides, estreptococos*, etc. Sabemos que precocemente, na colonização inicial, há uma predominância dos aeróbios facultativos e à medida que esses aeróbios facultativos vão povoando esse intestino e consumindo o O_2 local, vão transformando esse meio mais propício a que

apareçam os anaeróbios facultativos e posteriormente os anaeróbios patogênicos como *enterococos, estreptococos* e *enterobactérias*. Após 48 horas de vida os estudos já mostram em crianças em aleitamento materno a presença de *lactobacilos* e após uma semana diversificação maior com a presença de *bifidobactérias* e os *bacteroides*. A microbiota em várias partes de nosso corpo é diversificada, mas no nível intestinal observamos uma predominância dos filos *bacteroides* e *firmicutes* que vão caracterizar a flora intestinal do adulto, que na criança vem a ser semelhante à do adulto em torno de três anos de idade. Sabemos que o maior órgão linfoide em nosso corpo é o intestino e lá vamos encontrar o tecido linfoide associado ao tubo digestivo (GALT), que é o tecido linfoide onde temos 80% das células linfoides de nosso sistema imune. O GALT é complexo e é composto por células epiteliais intestinais, por células do sistema imunológico que constituem as Placas de Peyer, pelos canais de muco e pelas bactérias comensais – é a parte do microbioma intestinal que estará o tempo todo interagindo e influenciando o desenvolvimento do sistema imunológico.

Quanto à colonização do microbioma intestinal no início da vida, já no útero se admite que existam alguns microrganismos que se mantêm ao nascer, dependendo do tipo de parto. Na primeira infância, de acordo com o modo de alimentação, do estilo de vida familiar e da geografia nós vamos ter a *fitobactéria* e *proteobactérias* que podem se multiplicar com o uso dos antibióticos e a própria genética da criança. Admitia-se que o microbioma intestinal se consolidaria aos três anos de vida, aumentando a diversidade alfa e a complexidade funcional, mas ao mesmo tempo com uma diminuição das variações individuais bacterianas, chamada de diversidade beta. Isso vai

conferir modificações também em termos do metabolismo, uma vez que admitimos que o microbioma bacteriano é cem vezes superior ao humano e há milhares de moléculas que serão utilizadas em nosso detrimento ou em nosso próprio benefício.

O microbioma intestinal pode se desenvolver mais lentamente do que se pensava anteriormente (Derrien et al., 2019). Recentes observações apontam que a microbiota intestinal poderia demorar mais de três anos para se consolidar porque ela continua apresentando diferenças funcionais e taxonômicas em comparação com a dos adultos, ou seja, a diversidade alfa pode estar alterada assim como a melhor diferença entre crianças e adultos em termos de diversidade beta; além disso, na própria composição, nós observamos uma redução de espécies bacterianas e um aumento de *actinobactérias, bacilos* e *bacteroidetes*. Na verdade, novos estudos vêm apontando que ainda existem alterações entre crianças em idade escolar de seis a nove anos e adultos. Existe uma maior predominância de *bacteroidetes* e *actinobactérias*, justamente maior quantidade de *bifidobactérias* em crianças do que em adultos. Mas ainda também existem diferenças entre crianças de nove a 12 anos e adultos. Isto foi observado numa coorte de mais de 2000 crianças e quase 1500 adultos (Radjabzadeh et al., 2020). Os gráficos mostram uma menor diversidade em crianças com relação aos adultos: existe uma dissimilaridade na composição bacteriana, pois os gêneros das famílias *Fluminococcaceae* e *Bacteroidaceae* são mais abundantes em crianças e nos adultos, *Lachnospiraceae*; gêneros *bacteroides* são mais abundantes em crianças e predominam *bacteroidetes* e *actinobactérias* enquanto nos adultos predomina *Glaucia*.

A diversidade do microbioma humano estaria influenciado pela geografia, faixa etária e estilo de vida: 1) Novas ferramentas aumentam a capacidade de mapear os metagenomas intestinais em 87%. 2) Estudos metagenômicos de larga escala revelaram milhares de novas espécies no microbioma humano. 3) Populações não ocidentalizadas albergam uma grande fração das espécies recém-descobertas. Os estudos estão chegando à conclusão de que o mundo globalizado, com padrão ocidental de vida, o que inclui a dieta, tende a ter uma diversidade menor, um certo empobrecimento desse microbioma intestinal (Pasolli et al., 2019). Quando um indivíduo migra de uma região de baixo risco para doenças crônicas não transmissíveis ou doenças inflamatórias para uma região de alto risco, eles tendem a desenvolver aquelas doenças comparadas às populações locais; isso é tanto mais expressivo quanto mais cedo na vida ocorre essa migração e tem sido associado a modificações da microbiota. Então a microbiota intestinal refletiria as mudanças ambientais, geográficas e culturais, obviamente incluindo a dieta (Shanahan et al., 2020). Estudo mais recente sobre a interação da microbiota com fenômenos fisiológicos e da saúde sugere que a microbiota do passado anterior à Segunda Guerra Mundial, à antibioticoterapia e à Revolução Industrial teria um estímulo à imunidade inata predominante devido à riqueza desse contato com o meio ambiente, que aparentemente se perdeu com as gerações mais recentes: o RN hoje é exposto a um ambiente mais higiênico, menos diverso e menos rico em microrganismos, o que acaba estimulando pouco a imunidade inata em detrimento da imunidade adaptativa, que acaba tendo sua maturação alterada de uma forma que teoricamente estaria relacionada à perda de tolerância, reatividade excessiva, inflamatória, como

base de doenças crônicas e inflamatórias. Todas essas modificações do microbioma intestinal não somente afetam o trato gastrointestinal com doenças inflamatórias como Doença de Crohn ou colite ulcerativa, que são mutações associadas à disbiose; a microbiota também tem efeito sobre o aparelho respiratório, SNC, sistema imunitário, osteoarticular e cutâneo, além de atuar no metabolismo, obesidade, fígado e pâncreas (Goldszmid; Trinchieri, 2012).

O grande problema dessas doenças todas é determinar se essas modificações da microbiota intestinal seriam primárias ou secundárias; de qualquer forma a ideia de trabalhar com modulação do microbiota sempre vem à mente e começa-se com antibióticos, prebióticos, probióticos e simbióticos, infelizmente com pouco efeito, com pouco resultado. Mais recentemente tem-se trabalhado com a reposição de defensinas, que são peptídeos antimicrobianos basicamente produzidas pelas células de Panneth intestinais e que são reguladores da microbiota intestinal. Finalmente, temos o transplante fecal, que seria a troca da microbiota patogênica intestinal disbiótica por uma microbiota teoricamente normal de um doador saudável.

O Transplante de microbiota fecal: teria efeitos terapêuticos estabelecidos e potenciais nas: 1) Doenças gastrointestinais: Infecção por Clostridium, Doença inflamatória intestinal, Síndrome de Intestino Irritável e Constipação crônica. 2) Doenças não-gastrointestinais: Obesidade, Autismo, púrpura trombocitopênica imune (PTI) (associada a RCU), Distonia mioclônica (associada à diarreia), Doença de Parkinson (associada à Constipação crônica) e Síndrome de Fadiga Crônica (Aroniadis; Brandt, 2013).

Constituindo estratégias de manipulação microbiana para a manutenção da Microbiota Normal (Preidis; Versalovic, 2015): o estado atual dessas

estratégias, baseadas na microbiota tanto do ponto de vista diagnóstico como terapêutico para as doenças crônicas, ainda é muito incipiente. A ideia geral é que a microbiota disbiótica intestinal esteja associada com a progressão para fibrose da doença hepática e também associada com maior risco de descompensação de doença crônica; é associada também com alterações do eixo intestino-fígado-cérebro; a ideia é que estudos da microbiota seriam capazes de predizer um risco maior de descompensação e até indicar possibilidade de tratamento para evitar uma maior mortalidade e desenvolvimento de complicações. É difícil entender qual é o papel dos fatores ambientais como a dieta, e controlar esses fatores, a coleta e as análises das amostras biológicas não é simples, exige conhecimento de bioinformática sofisticada, técnicas e estatísticas que não são as comuns. São estudos de números muito altos e a interpretação é muito difícil ainda para nós. No momento gostaríamos de ter o conhecimento sobre o papel da microbiota ou da disbiose na indução ou maior risco de infecções e de hemorragia digestiva, etc., bem como entender o papel da disbiose nas múltiplas etiologias das doenças. Ainda não se sabe bem como a disbiose se comporta ou se existem padrões específicos de disbiose nessas diferentes formas de doenças. A ideia é que futuramente, com maiores conhecimentos e maior controle dos testes laboratoriais, haja melhor interpretação dos testes para entender qual o papel da microbiota e atuar sobre este papel. Por exemplo, utilizar intervenções dietéticas específicas que permitam modificações mais consistentes e permanentes da microbiota, protetores da saúde, o uso de controles externos da microbiota que não sejam baseados em uso de antibióticos, pois a resistência antimicrobiana vem aumentando assustadoramente; a utilização de

metabólitos da microbiota seria também interessante, com base no conhecimento de microbiología e da microbiota intestinal. Um trabalho recente realizado na Índia avaliou a possibilidade de transplante de microbiota fecal em doenças graves como hepatite alcoólica grave com sobrevida maior aos tratados com tratamento convencional. Depois de seis meses a um ano do transplante houve modificação dos filos e das espécies bacterianas, o que aparentemente tem a ver com o estado metabólico e a expressão de genes do microbioma associado a uma maior sobrevida; este estudo piloto mostra que outra intervenção mais radical pode trazer mais efeitos benéficos sobre as doenças (Acharya; Bajaj, 2021).

O termo “sepse neonatal” é usado para designar uma infecção sistêmica, de origem bacteriana, viral ou fúngica, associada a alterações hemodinâmicas. Presumida quando não foi identificado o agente causal.

Exposição materna e infantil a antibióticos: A exposição precoce a antibióticos durante a gestação ou no início da vida do bebê pode ter influências de curto e longo prazo sobre e desenvolvimento do microbioma intestinal. O fornecimento de antibióticos no primeiro ano de vida está associado ao aumento do risco para obesidade, doença inflamatória intestinal e atopias. Além disso, o uso precoce destes antibióticos cria uma situação chamada resistoma, onde essas bactérias têm genes que causam resistência ao uso desses antibióticos (Kapourchali; Cresci, 2020; McKeen et al., 2019; Millani et al., 2017; Nogacka et al., 2017).

Estudos mostram que a exposição pré-natal a antibióticos está ligada a crianças com sobrepeso em idade escolar, independentemente do tipo de parto: quanto maior o tempo e quanto mais precoce o uso, maior é o risco de

obesidade. Os expostos apresentaram 84% maior risco de obesidade, após ajuste multivariado (Muller et al., 2016). Outro estudo mostra que a exposição pré-natal a antibacterianos sistêmicos está associada a um aumento de risco de sobrepeso e obesidade na idade escolar (Mor; Kwon, 2015). Outro estudo mostra que a exposição aos antibióticos ao longo do primeiro ano de vida está associada ao desenvolvimento de obesidade e adiposidade central com 12 anos de idade – os bebês foram divididos em faixas de zero a três meses, de três a seis meses e de seis a 12 meses (Azad et al., 2014). Além dessas doenças crônicas e de saber que se faz uma programação metabólica, deve-se incluir a formação de uma microbiota saudável como um fator envolvido nela, considerando os fatores perinatais, os fatores gestacionais, os fatores peri parto. Os fatores pós-natais como alimentação, a interação mãe e filho, ganho de peso materno e do bebê intervêm diretamente na formação da microbiota saudável e logo depois a alimentação ao longo da vida. Porque alguns estudos já mostram que as alterações epigenéticas que acontecem através da interação dos genes bacterianos com os nossos genes na fase precoce de vida se perpetuam, mesmo que essa criança tenha alimentação saudável, por isso as doenças crônicas, atópicas e alérgicas permanecem pelo resto da vida. Neste sentido, tudo isto pode ter uma aplicabilidade prática para as crianças que nasceram de parto cesáreo, que não têm uma alimentação adequada pela antecipação dos produtos processados, no sentido de que essa microbiota possa ter a diversidade a mais adequada possível. A formação da microbiota saudável já está dentro daquelas medidas preventivas dos primeiros mil dias e que começam na gestação: a consulta pré-natal com o pediatra é essencial para que ele possa orientar seu paciente já desde o intraútero, identificar os

fatores de risco naquela família e começar a intervir na mudança de estilo de vida daquela mãe; nosso paciente ainda vai nascer, vai estar exposto, o meio externo não é estéril, sabemos que existe um funcionamento que é superior ao nosso conhecimento e a nossa capacidade de identificação do funcionamento destas bactérias, como elas interagem com o nosso material genético. Existem fatores como um bom pré-natal; nem sempre conseguiremos parto normal, mas existem outras condições, como o aleitamento materno, e outros fatores ambientais e maternos que também vão interferir. Alguns autores falam de promover contato com a secreção vaginal materna depois do parto cesáreo no RN; há fórmulas com probióticos, suplementação de prebióticos em cólicas infantis e na prevenção de ECN nos prematuros. Não temos, metodologicamente falando, estudos com protocolos, mas temos a prevenção: o fato de a mãe ter uma alimentação adequada modifica a microbiota intestinal da criança e os primeiros dias de vida são importantes para a fermentação dessa microbiota, são importantes para as alterações epigenéticas porque podem modular essa microbiota. Entretanto, algumas alterações neste período permanecem ao longo da vida, por isso temos que ter habilidade de fazer a prevenção: aleitamento materno, uma alimentação complementar adequada, ter contato com animais de estimação, terra, plantas, contato com o ambiente ao ar livre e interagir com outras crianças de diversas classes sociais e de diversas faixas etárias é o que vai promover e prevenir os danos causados pela disbiose.

Eixo Cérebro- Intestino- Microbiota nos Primeiros Mil Dias

O cérebro e o intestino se comunicam de forma dinâmica e complexa através de diferentes vias, formando um eixo direcional, cujo equilíbrio depende da composição da comunidade microbiana que habita o intestino (Silvestre, 2015). Como pode o microbioma se conectar com o cérebro? O sistema nervoso intestinal está composto por duzentos a seiscentos milhões de neurônios, constituindo a maior e mais complexa rede neuronal do sistema nervoso periférico (SNP) e autônomo (Plexos de Auerbach e Meissner), que interage com a comunidade microbiana e com seus metabólitos também, os quais modulam o SNC (Forsythe; Bordenstein, 2010). À medida que a motilidade intestinal sofre ação do SNC, com secreção de mucina (formando uma camada que protege a mucosa intestinal), ocorre a produção dos hormônios intestinais e gástricos, produção de citocinas pelas células do sistema imune intestinal, que têm uma ação direta no SNC; aparecem os estímulos vagais e também existe a via ao contrário, a produção de serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA), catecolaminas, acetilcolina e histamina, que o intestino produz e atuam sobre o comportamento cerebral.

Portanto, os nutrientes da dieta, bactérias da microbiota e seus metabólitos presentes no lúmen intestinal são capazes de interagir com o sistema nervoso central e afetar a fisiologia do cérebro do lactente, durante janelas temporais críticas de desenvolvimento, com possíveis implicações estruturais e funcionais ao longo da vida através do eixo intestino-cérebro.

Os primeiros mil dias representam uma janela crítica de crescimento e desenvolvimento na primeira infância, existindo nesse período uma rápida maturação das vias metabólicas, endócrinas, neurais e imunológicas.

Existe uma perspectiva emergente da biologia do desenvolvimento humano que inclui os trilhões de micróbios (microbiota) e seus genes (microbioma) que residem no corpo humano e que se agrupam e se estabilizam durante os primeiros três anos de vida. Essa colonização desempenha um papel crítico no estabelecimento e maturação das vias de desenvolvimento. A interrupção desta sucessão microbiana ideal pode contribuir para déficits intergeracionais e ao longo da vida no crescimento e desenvolvimento (Tamburini et al., 2016).

A importância do Momento e o Tipo de colonização: Durante a gravidez, existe uma constância da microbiota, uma microbiota vaginal com baixa diversidade e rica em *Lactobacilos* está associada ao nascimento a termo e ao peso normal ao nascer. A microbiota vaginal mais diversa, rica em *Prevotella spp, Gemella spp* e *Corynebacterium* está associada à redução de escore Z de diversidade no RN. O crescimento saudável está associado a maiores quantidades de *Bifidobacterium longum* e *Streptococcus thermophilus* nos primeiros seis meses de vida. A amamentação durante este período está associada a *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. As maiores densidades de *Akkermansia muciniphila, Methanobrevibacter smithii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus* e anaeróbios obrigatórios estão associados ao crescimento. *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* e outras espécies estão associadas à desnutrição. O fato é que em torno dos três anos o indivíduo vai atingir a microbiota que terá o resto da sua vida.

Sucessão de formação da microbiota: O microbioma da gestante, o tipo de parto, idade gestacional, leite materno exclusivo e uma adequada nutrição irão promover uma microbiota saudável. Existe uma colonização bacteriana em estágios diferentes dos mil dias (Wang et al., 2020). A integridade, estrutura e função de barreira intestinal é regulada pela composição dessas bactérias intestinais: se elas forem de boa qualidade, temos maior resistência aos patógenos.

As vias pelas quais os micróbios do lúmen intestinal interagem com o crescimento e desenvolvimento:

- A integridade estrutural e funcional da barreira intestinal (camada de muco, peptídeos antimicrobianos, epitélio e junções) é rigidamente regulada pela composição microbiana do intestino.
- Resistência à colonização contra patógenos invasores.
- A interação entre o microbioma comensal e o sistema imunológico inato mantém a homeostase imunológica e o reconhecimento de antígenos. O microbioma do hospedeiro também regula a atividade do eixo somatotrófico (fatores de crescimento semelhante a insulina (GH/ IGF-1)) para estimular o crescimento no início da vida.
- Desempenha papel crítico no metabolismo dos nutrientes do hospedeiro, afetando a digestão, absorção e o armazenamento de energia (Tamburini et al., 2016).

O microbioma disbiótico no início da vida:

- Prejudica cada uma das vias relacionadas ao crescimento, falha em proteger a barreira intestinal, levando ao embotamento das

vilosidades, degradação do muco, permeabilidade intestinal e respostas imunológicas prejudicadas.

- Essas deficiências intestinais podem contribuir para a disfunção entérica ambiental (EED), inflamação sistêmica crônica, morbidade infecciosa e diarreia.
- Uma “combinação de acertos” pode ser necessária para induzir a disfunção entérica ambiental e a desnutrição, incluindo uma dieta insuficiente ou inadequada, transporte de patógenos e/ou um microbioma disbiótico.
- A disbiose microbiana também pode prejudicar o metabolismo de nutrientes essenciais, incluindo aminoácidos essenciais, impedindo assim o crescimento normal.
- O uso de probióticos está sendo analisado há alguns anos e há algumas metanálises que mostram o efeito positivo. No entanto, de todos os probióticos estudados, em que alguns têm ou não efeito positivo, parece que a associação de alguns deles tem um efeito melhor. Na verdade, também esse estudo de Braegger et al., apresentado na ESPGHAN 2019, não tem uma indicação precisa de qual probiótico seria utilizado; na verdade o uso do leite humano, seja ele cru ou pasteurizado, sem dúvida é a melhor estratégia terapêutica que nós temos para a prevenção da ECN (Van den Akker et al.,2020).
- A prevenção, provavelmente com o uso do colostro pasteurizado, está relacionada aos oligossacarídeos do leite humano, onde há uma melhora da disbiose, há uma melhora da resposta anti-

inflamatória e há uma melhora na microcirculação mesentérica à medida que se estuda essas crianças e se faz a modulação de alguns nutrientes que podem melhorar a imunidade intestinal desses RN.

- A melhor situação é o uso da nutrição enteral, abreviação do jejum e também a modulação do microbioma intestinal através de pré e probióticos. Esse é um estudo que mostra a introdução da nutrição enteral mesmo naquelas crianças que estão com sonda ou com tubo de um período muito prolongado e quando utilizamos a nutrição enteral há uma marcante redução dos filos das *proteoacterias*,. com diminuição das bactérias patogênicas.
- Prebióticos como oligossacarídeos têm um efeito bifidogênico também e são utilizados em muitas ocasiões em crianças que apresentam fezes diarreicas durante o uso da nutrição enteral.
- A utilização de probióticos, com algumas indicações baseadas em algumas evidências científicas, mostra a sua utilidade em diarreias associadas ao uso do antibiótico, tratamento de gastroenterocolite aguda e algumas questões relacionadas a infecções graves. Por exemplo, em algumas situações é utilizado até o transplante fecal para melhorar a disbiose que ocorre nessa situação. As metanálises ainda demonstram que na verdade nós temos uma série de probióticos e uma série de prebióticos na unidade de terapia intensiva (UTI) pediátrica que precisam ser utilizados de maneira muito criteriosa. Sem dúvida, precisamos considerar que o uso em uma UTI neonatal e pediátrica deve obedecer a alguns

critérios, como por exemplo que espécie de cepa estamos utilizando, qual é o produto que nós estamos utilizando, se é cepa única ou múltipla, qual é a dose que estamos utilizando, o tipo de formulação, a qualidade e sobretudo o grau de evidência que nós temos na utilização de determinado pré/probiótico na associação dos probióticos com os prebióticos para utilizar no tratamento dessas crianças gravemente enfermas. Ou seja, o uso de pré e/ou probióticos é extremamente interessante, porém não se deve encorajar o seu uso, a não ser que tenhamos evidências dos seus benefícios, principalmente em uma criança gravemente enferma em uma UTI neonatal ou pediátrica.

- Uma composição alterada da microbiota intestinal pode prejudicar a produção normal de hormônios do crescimento (Tiffon; 2018; Paparo, 2016). No lactente existe uma imaturidade do sistema imune tanto do adaptativo como do inato (Sharma et al., 2012). É uma dependência da imunidade da microbiota desde o nascimento. Existem fatores que influenciam a homeostase do microbioma da concepção até os três anos de vida, como por exemplo o uso de antibióticos, ambiente não saudável, infecções e maus hábitos alimentares levam a uma composição da microbiota não saudável, enquanto o parto vaginal, aleitamento materno exclusivo e outros hábitos saudáveis levam a uma composição de microbiota normal (Smilowitz et al., 2017). Existe também uma programação paralela entre neurodesenvolvimento e microbioma. O microbioma tem um papel nas desordens emocionais e nas desordens do espectro

autista, levando à conformação de um estado psíquico não saudável da pessoa (Vuong, 2017).

Relembrando o conceito de **nutrição, cérebro e microbiota** podemos afirmar que o microbioma age protegendo a formação e integridade da matriz encefálica desde o nascimento até a velhice. Um estudo realizado por Braniste et al. em 2014, mostrou como a microbiota intestinal influencia na permeabilidade da barreira hematoencefálica em ratos com uma maior permeabilidade da barreira hematoencefálica. Este aumento da permeabilidade mantido após o nascimento e durante a idade adulta é a expressão reduzida das proteínas de junção ocludina e claudina-S (reguladores da função de barreira em tecidos endoteliais).

Em complementaridade, a utilização de antibióticos apresenta uma importante influência na composição da microbiota intestinal e, em pacientes pediátricos, a utilização em amplo espectro pode comprometer a função da barreira intestinal contra patógenos, representando um risco inclusive para o desenvolvimento da ECN. No entanto, tanto em neonatos com falha intestinal bem como em neonatos prematuros, tem-se pouco conhecimento sobre como os antibióticos alteram o estabelecimento da microbiota intestinal (Torrazza; Neu, 2013; Wong et al., 2017).

Bebês RN graves internados em Unidades de Cuidado Intensivo (UCI), principalmente aqueles que apresentam complicações do TGI, estão ainda mais susceptíveis às influências ambientais; com a consequente desordem da microbiota intestinal é possível a proliferação de bactérias patogênicas. Esses bebês são tratados com antibióticos de amplo espectro, nutrição parenteral prolongada e ausência de aleitamento natural ou artificial, além de

permanecerem em incubadoras por longos períodos (Manzoni et al., 2013). Esses fatores ambientais, associados a dificuldades de alimentação, diminuem a colonização intestinal por bactérias simbiontes como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, importantes no processo de maturação intestinal de lactentes (Manzoni et al., 2013), levando a uma colonização anormal do TGI.

A gastrosquise e onfalocele são condições relacionadas a defeito no fechamento da parede abdominal durante o desenvolvimento intraútero. Na gastrosquise, há um defeito total na espessura da parede abdominal, de localização paraumbilical, com protusão do intestino ou órgãos abdominais para a cavidade amniótica. A onfalocele é definida pela projeção do intestino além de outros órgãos abdominais revestidos pelo saco peritoneal na cavidade amniótica (Prefumo; Izzi, 2013).

Entre outras malformações do trato gastrointestinal temos a Atresia Intestinal Neonatal que constitui a malformação congênita obstrutiva do trato gastrointestinal neonatal, segundo alguns estudos representa 1.6% das admissões em UTI Neonatal e 75% precisaria de correção cirúrgica. (Verma et al., 2016).

A hérnia diafragmática congênita é um defeito de formação do diafragma que acomete entre 1:2.000 e 1:4.000 nascidos vivos e constitui 8% das principais anomalias congênitas. Avanços médicos nos últimos 30 anos envolvendo diagnóstico pré-natal, intervenção fetal, manejo clinico e cirúrgico neonatal têm mudado a sobrevivência dos seus portadores. (Greer et al, 2013).

Dentre as complicações mais encontradas em neonatos com defeitos de fechamento da parede abdominal e outros defeitos do trato gastrintestinal, destacam-se: dismotilidade, íleo paralítico, deficiências de absorção, isquemia,

necrose e sepse (Prefumo; Izzi, 2013). A conduta terapêutica é a cirurgia no pós-parto imediato, com suporte hídrico, jejum e nutrição parenteral prolongada, uso de protetores gástricos (Omeprazol), suporte ventilatório que faz necessário o uso de sedativos contínuos e em bolus, além do uso de antibióticos de amplo espectro e manipulações cirúrgicas (Dicken et al., 2011).

A dismotilidade intestinal ou íleo adinâmico no pós-operatório é uma complicação frequentemente presente, fazendo-se necessário o uso de nutrição parenteral por longos períodos, possibilitando assim o surgimento de trombos na veia cava superior e aumentando a predisposição à sepse (Tannuri et al., 2010). Estudos mostram que a introdução precoce gradual de leite materno em bebês com gastrosquise sujeitos aos agravos mencionados está associada à diminuição do tempo de internação desses neonatos (Tannuri et al., 2010; Coker et al., 2020).

Com o advento da biologia molecular e mais especificamente as metodologias de sequenciamento com alta eficiência ("*high throughput*"), tem-se tornado possível o estudo das comunidades bacterianas e sua influência no metabolismo do organismo, bem como o envolvimento em patologias importantes (Clavijo et al., 2018).

Ainda é precoce no Brasil o estudo da composição da microbiota intestinal em crianças saudáveis e não há estudos em crianças críticas utilizando as metodologias de sequenciamento de alta eficiência. Nestes grupos de crianças aqui relacionados, a verificação do aumento ou diminuição de gêneros importantes da microbiota intestinal pode estar relacionado com insuficiência intestinal, constituindo-se em ferramentas importantes no controle da mesma.

A microbiota intestinal constitui um órgão da Fisiologia Humana: que o microbioma intestinal possa ser mais bem compreendido para poder formar uma rede de conhecimentos, rede regulatória que permita localizar os pontos chave desses múltiplos órgãos. Conseguir aproximação com essa tão sonhada medicina de precisão não é fácil quando lidamos com esses números de grande valor como os da microbiota intestinal. Concluímos que a microbiota intestinal tem se consolidado como um órgão da fisiologia humana com interação, integrando os órgãos não somente do aparelho digestivo, pois do ponto de vista sistêmico tem grande importância (Phillips et al., 2017).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A microbiota intestinal dos RN termos e prematuros está sendo amplamente pesquisada devido à sua importante função no desenvolvimento de diferentes doenças. Algumas condições, como gastrosquise e onfalocele, são defeitos congênitos cirúrgicos que se apresentam ao redor de 1: 1000 recém-nascidos vivos, outras malformações do trato gastrointestinal, existindo uma estreita relação entre a alimentação destes RN no pós-operatório e a colonização do trato gastrointestinal.

O conhecimento da colonização do trato gastrointestinal pode ajudar a prevenir a sepse e dificuldades na adaptação intestinal tão frequentes na evolução destas crianças. Há poucos estudos para a compreensão da interação que existe entre a microbiota e o epitélio do trato gastrointestinal. Análises de amostras de fezes dos poucos estudos clínicos e experimentais mostram que a densidade e distribuição das espécies bacterianas são altamente variáveis e que isto não dependeria apenas da idade gestacional do recém-nascido, senão também pelo tipo de parto e principalmente pelo tipo de dieta, pela evolução clínica quando internado em UTI neonatal e acometido por diversas patologias, como também quando submetidos a correções cirúrgicas.

3. HIPÓTESE

Descrevendo a microbiota intestinal de RN com defeitos congênitos do trato gastrointestinal submetidos a cirurgia, internados na UTI, durante o período de internação até a alta, visando o acompanhamento das alterações da microbiota intestinal e estabelecendo possíveis relações com a terapêutica utilizada, visando melhorar a adaptação intestinal destes lactentes.

4. OBJETIVOS

Geral

I. Caracterizar a microbiota intestinal em RN com defeitos congênitos intestinais após correção cirúrgica até a alta hospitalar.

Específicos

II. Descrever as possíveis modificações do microbioma intestinal relacionadas com tempo de jejum, duração da nutrição parenteral total, introdução da alimentação enteral, ganho ponderal, episódios de sepse, uso de antibioticoterapia e tempo de permanência hospitalar.

5. MÉTODOS

Casuística

Trata-se de estudo prospectivo longitudinal no período de 01/01/2015 a 31/06/2016. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), bem como pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP. Pacientes incluídos após assinatura do consentimento livre e esclarecido pelos pais e responsáveis legais (vide formulário anexo).

Critérios de Inclusão

Foram incluídos RN internados na UTI neonatal do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas de São Paulo, os quais apresentavam defeitos congênitos da parede abdominal: Gastrosquise, Onfalocele, Atresia Intestinal ou Hérnia Diafragmática, os quais foram submetidos à correção cirúrgica.

Critérios de Exclusão

Foram excluídos RN com prematuridade moderada, prematuridade extrema, enterocolite necrosante e outras malformações.

As condições clínicas envolvidas com a internação na Unidade foram registradas em formulário específico para esta pesquisa (vide anexo). Os dados coletados foram antecedentes pré-natais, maternos e neonatais. Durante a internação, diariamente foram anotados dados referentes ao: tempo de jejum, uso de nutrição parenteral prolongada (NPP) e tempo de uso, início e qualidade da alimentação enteral ministrada ao RN, uso de antibioticoterapia e tempo de uso, além de intervenções medicamentosas e cirúrgicas.

Análise laboratorial da microbiota intestinal

Origem e coleta do material

As amostras de fezes foram colhidas durante o período de internação, sequencialmente, a cada sete dias, até a alta da unidade, diretamente das fraldas, dependendo da frequência de evacuação de cada paciente. Nos pacientes que não apresentaram funcionamento intestinal e estiveram com sonda gástrica, as amostras foram coletadas do conteúdo gástrico da sonda orogástrica.

As amostras coletadas foram imediatamente colocadas em refrigerador na Unidade e transferidas em gelo para armazenamento em freezer a -80°C, até o momento do uso, no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Extração de DNA

O DNA bacteriano foi extraído das amostras coletadas utilizando o kit QiaAmp DNA Stool (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante, e armazenados a -20°C até o momento do uso.

Sequenciamento e Análise de bioinformática

A amplificação da região V4 do gene 16SrRNA foi realizada por técnica de PCR, conforme descrito anteriormente (Kozich et al., 2013). Todos os procedimentos foram realizados seguindo o protocolo do fabricante (*Illumina* –

16S Metagenomic Sequencing Library Preparation). Posteriormente, os amplicons obtidos foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina Miseq.

Para explorar os resultados, as sequências obtidas foram analisadas através do software QIIME v.1.9.1 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*), uma ferramenta utilizada para análise metagenômica (Caporaso et al., 2010; Zhuang et al., 2019). O software foi utilizado para a demultiplexação das amostras, remoção dos *barcodes* e remoção de quimeras. As sequências remanescentes foram então agrupadas em OTUs e comparadas com o banco de dados Silva, versão 128, utilizando 97% de similaridade (Quast et al., 2013). Dessa forma, por comparação, foram identificados os filos e gêneros a que pertencem.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS Statistical Analysis Software versão 22. Para caracterizar os principais filos e gêneros encontrados na microbiota intestinal no período basal, os recém-nascidos foram distribuídos de acordo com a malformação apresentada (gastrosquise, onfalocele e atresia/hérnia) e foi realizado o teste *General Mixed Model* (GMM) com pós-teste Sidak. Considerando o padrão da microbiota intestinal ao final do período de internação, a análise com GMM com pós-teste de Sidak foi utilizada na comparação entre o uso de antibióticos (mais de 3 ciclos de antibióticos x menos de 3 ciclos de antibióticos) e a ocorrência de sepse (houve sepse x não houve sepse).

Para avaliar a correlação entre a NPP e o tempo de jejum com os filos e gêneros bacterianos encontrados ao final da internação hospitalar, foi realizado

o teste de correlação de Spearman (*two-tailed)*. Em todas as análises o valor de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

No presente estudo, foram incluídos 30 RN com defeitos congênitos da parede abdominal, os quais foram divididos em grupos de acordo com a malformação apresentada: gastrosquise (n=18), onfalocele (n=8) ou atresia/hérnia (n=4). Os RN com atresia/hérnia foram unificados para fins de comparação estatística. A Figura 1 mostra o fluxograma do acompanhamento dos RN incluídos neste estudo.

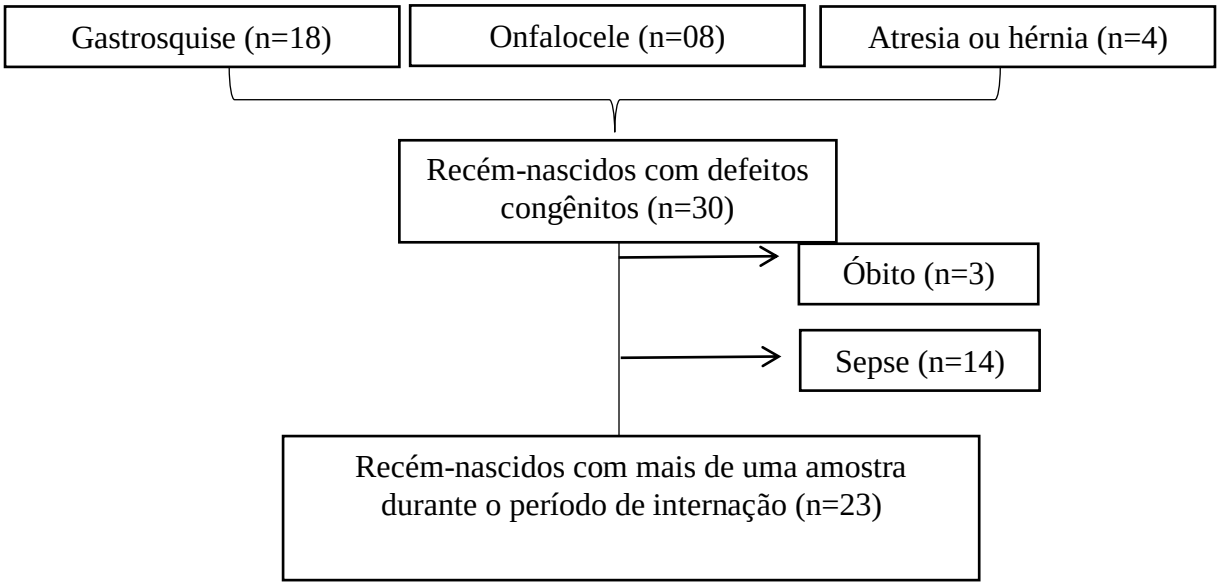

Figura 1- Fluxograma do acompanhamento dos RN

No grupo de RN com gastrosquise, a maioria era do sexo masculino (66,7%) e o nascimento foi por parto cesáreo (72,2%). No grupo com onfalocele, foi observada uma porcentagem igual de RN em relação ao sexo e todos nasceram de parto cesáreo. No grupo com atresia ou hérnia, a maior parte era do sexo masculino (75%) e nasceu de parto vaginal (75%). Com relação à idade gestacional, todos os RN com onfalocele nasceram a termo.

O tempo médio de internação no grupo com gastrosquise foi de 75,5 ± 67,4 dias, superior ao observado no grupo com onfalocele (48,5 ± 42,9) e no grupo com atresia / hérnia (43,7 ± 21,6). O mesmo foi observado no tempo de nutrição parenteral plena (NPP): o grupo com gastrosquise recebeu NPP por 49,8 ± 31,3 dias, enquanto o grupo com onfalocele recebeu NPP por uma média de 28,6 ± 28,9 dias e o grupo com atresia ou hérnia por uma média de 35,5 ± 19,7 dias. Neste contexto, o tempo de jejum médio observado também foi maior no grupo com gastrosquise (60,4 ± 90,2 dias), em relação ao grupo com onfalocele (13,1 ± 7,4) e ao grupo com atresia / hérnia (28,2 ± 18,8). Todos os grupos apresentaram altas taxas de sepse, sendo de 50% no grupo com gastrosquise, 62,5% no grupo com onfalocele e 75% no grupo com atresia/hérnia. Por consequência, a utilização de antibioticoterapia também foi elevada nesses grupos – 50% dos RN com gastrosquise, 62,5% daqueles com onfalocele e 75% daqueles com atresia / hérnia utilizaram mais do que 3 ciclos de antibióticos durante o tempo de internação. Os dados gerais e clínicos podem ser observados na Tabela 1, os dados de gênero na Figura 2.

DADOS DEMOGRÁFICOS:

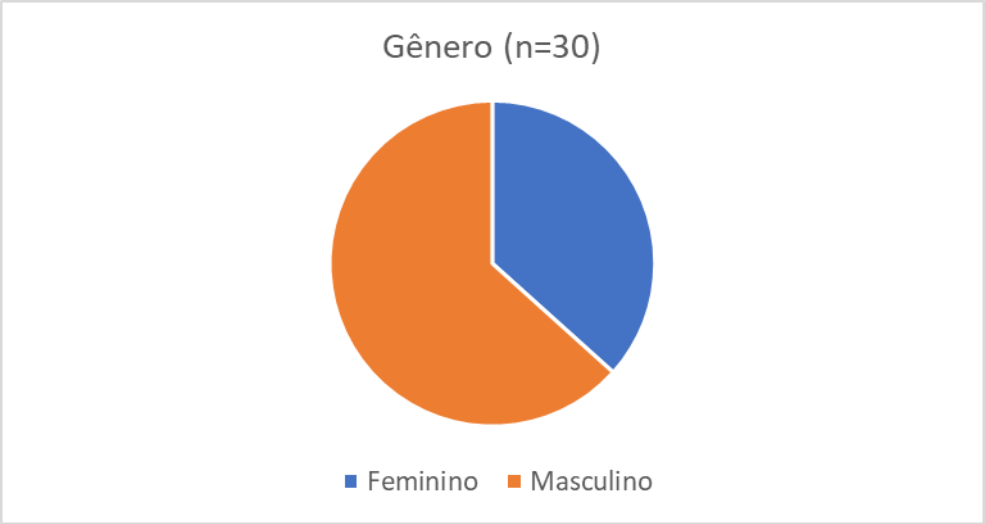

Figura 2- Gênero

Tabela 1- Dados gerais e clínicos

Variável	**Gastrosquise (n=18)**	**Onfalocele (n=8)**	**Atresia / hérnia (n=4)**
Sexo			
Feminino	6 (33,3%)	4 (50%)	1 (25%)
Masculino	12 (66,7%)	4 (50%)	3 (75%)
Tipo de parto			
Cesárea	13 (72,2%)	8 (100%)	1 (25%)
Vaginal	5 (27, 8%)	0	3 (75%)
Peso ao nascimento (g)[2]	2399,4 ± 662,4	3016,2 ± 670,5	2577,5 ± 337,9
Peso na 1ª semana (g)	2497,1 ± 579,2	3010,6 ± 691,2	2488,7 ± 543,4
Peso na 2ª semana (g)	2589,1 ± 591,7	3190,6 ± 772,5	2561,2 ± 320,4
Peso na 3ª semana (g)	2773,4 ± 614,3	3335,7 ± 856,1	2698,7 ± 375,6
Peso na 4ª semana (g)	2941,3 ± 619,9	3637,0 ± 857,9	2828,7 ± 265,7
Peso na 5ª semana (g)	3081,0 ± 535,7	3499,0 ± 896,2	3063,3 ± 252,6
Peso na 6ª semana (g)	3090,4 ± 450,3	3948,3 ± 887,5	
Idade gestacional			
Termo	8 (44, 4%)	8 (100%)	1 (25%)
Pré-termo	10 (55, 6%)	0	3 (75%)
Sepse			
Sim	9 (50%)	3 (37,5%)	2 (50%)
Não	9 (50%)	5 (62,5%)	2 (50%)
Mais de 3 ciclos ATB			
Sim	9 (50%)	3 (37,5%)	1 (25%)
Não	9 (50%)	5 (62,5%)	3 (75%)
Tempo de jejum (dias)	60,4 ± 90,2 (13-377)	13,1 ± 7,4 (3-21)	28,2 ± 18,8 (10-54)
Tempo de internação (dias)[1]	75,5 ± 67,4 (6-261)	48,5 ± 42,9 (9-128)	43,7 ± 21,6 (30-76)
Tempo NPP (dias)	49,8 ± 31,3 (16-120)	28,6 ± 28,9 (7-98)	35,5 ± 19,7 (19-64)

[1] os dados estão apresentados em média ± desvio padrão (mínimo – máximo); [2] média ± desvio padrão; g (gramas); ATB = antibióticos.

A evolução do peso semanal de cada paciente se observa na Figura 3.

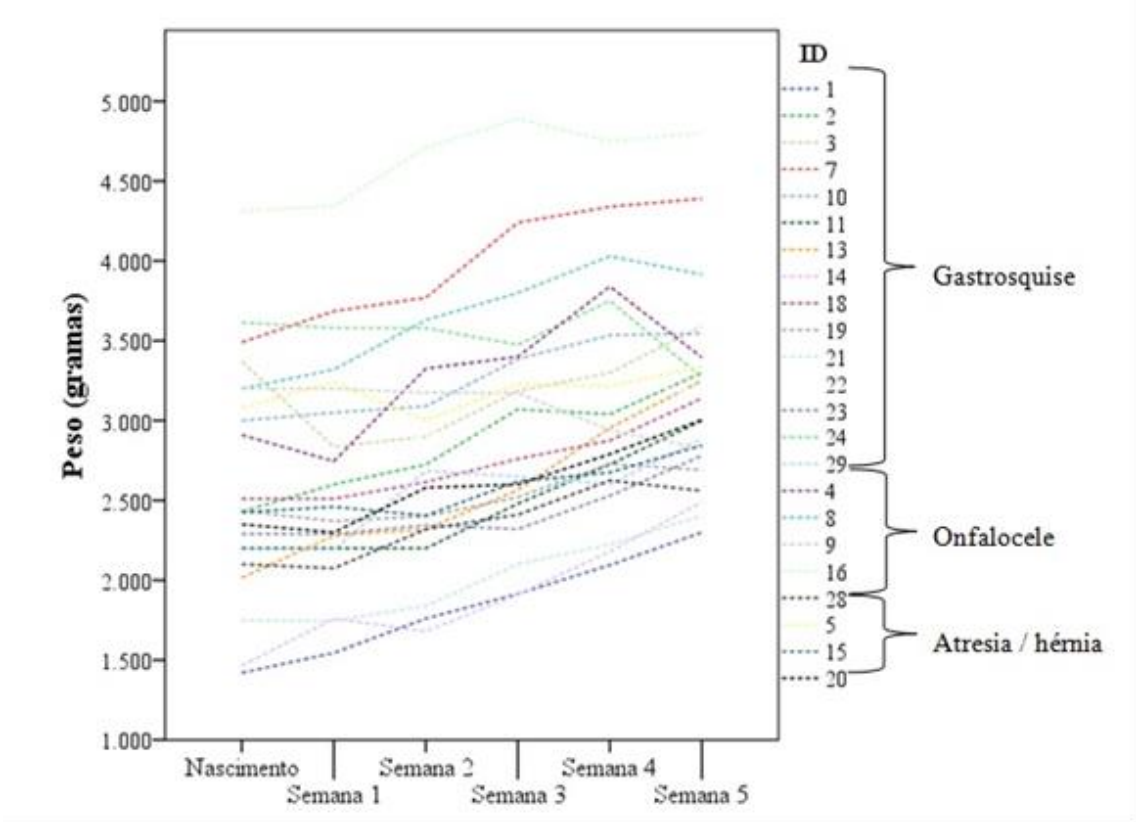

Figura 3- Evolução do peso semanalmente para cada RN

Análise de Filos e Gêneros Bacterianos – Ao Nascimento

Para observar se os grupos apresentavam uma distribuição similar da composição microbiana no início da vida, a análise dos principais filos e gêneros observados com a primeira amostra de cada RN foi realizada, utilizando a primeira amostra coletada de cada RN, independentemente da semana de vida. O filo mais abundante nos grupos foi *Firmicutes*, com prevalência no grupo com atresia / hérnia (59,4 ± 45,3). O segundo filo mais abundante foi *Proteobacteria*, com maior prevalência no grupo com onfalocele (44,7 ± 38,2). Nenhuma análise de filos entre grupos de acordo com a

malformação apresentou significância estatística. Os resultados podem ser observados na Tabela 2 e na Figura 4.

Tabela 2- Análise dos filos microbianos ao nascimento

Variável	**Gastrosquise**	**Onfalocele**	**Atresia / hérnia**	**Valor do teste**	***P***
Actinobacteria	3,35 ± 4,15	0,78 ± 1,39	0,42 ± 0,72	2,285	0,12
Bacteroidetes	10,33 ± 15,9	3,86 ± 9,5	3,47 ± 6,6	0,830	0,44
Firmicutes	49,7 ± 29,2	49,4 ± 32,6	59,4 ± 45,3	0,157	0,85
Proteobacteria	34,5 ± 29,2	44,7 ± 38,2	36,4 ± 44,7	0,249	0,78

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores de *P* são baseados no *GMM* e confirmados com o pós-teste Sidak; *Diferença significativa entre o grupo Gastrosquise e o grupo Onfalocele; #Diferença significativa entre o grupo Gastrosquise e o grupo Atresia/hérnia, £Diferença significativa entre o grupo Onfalocele e o grupo Atresia/hérnia.

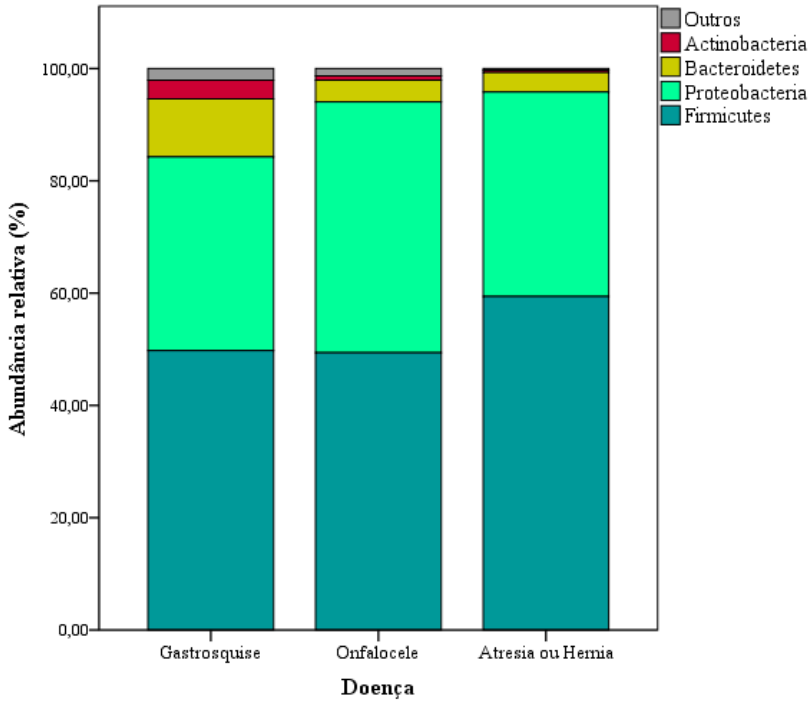

Figura 4- Principais filos observados no período basal

Em relação aos principais gêneros observados entre os grupos ao nascimento, os resultados podem ser observados na Tabela 3. O principal gênero observado no grupo com onfalocele e no grupo com atresia/hérnia foi *Staphylococcus* (25,78 ± 37,9 e 28,55 ± 41,9, respectivamente), o qual foi o segundo mais abundante no grupo com gastrosquise (13,50 ± 28,6). O gênero mais abundante no grupo com gastrosquise foi *Streptococcus* (14,34 ± 21,3), porém estes resultados não apresentaram significância estatística.

Outros gêneros abundantes nos grupos foram *Gemella*, o qual estava significativamente maior no grupo atresia/hérnia (17,61 ± 35,2) em relação ao grupo com gastrosquise (0,32 ± 0,7) – p=0,04; o gênero *Lactobacillus*, encontrado significativamente maior no grupo atresia/hérnia (3,35 ± 6,7) em relação ao grupo com gastrosquise (0,15 ± 0,2) – p=0,05 e o gênero *Serratia*, que também apresentou abundância significativamente maior no grupo atresia/hérnia (23,02 ± 45,8) em relação ao grupo com gastrosquise (0,35 ± 0,4) – p=0,04. As demais comparações de gêneros entre os grupos não apresentaram significância estatística. Os resultados desta análise podem ser observados na Tabela 3 e na Figura 5.

Tabela 3- Análise dos gêneros microbianos no início da vida

Variável	Gastrosquise	Onfalocele	Atresia / hérnia	Valor do teste	*P*
Bifidobacterium	0,48 ± 1,2	0,05 ± 0,1	0,20 ± 0,4	0,615	0,54
Corynebacterium	0,11 ± 0,2	0,36 ± 0,8	0,07 ± 0,09	0,999	0,38
Bacteroides	4,64 ± 10,0	1,40 ± 3,9	0,57 ± 0,8	0,672	0,52
Odoribacter	0,47 ± 0,9	0,03 ± 0,1	0,05 ± 0,1	1,073	0,35
Prevotella	1,57 ± 2,1	0,36 ± 0,9	2,62 ± 5,2	1,244	0,30
Alistipes	1,71 ± 3,4	0,73 ± 2,1	0,07 ± 0,1	0,674	0,51
Gemella	0,32 ± 0,7	0,01 ± 0,03	17,61 ± 35,2	3,632	**0,04**[#]
Staphylococcus	13,50 ± 28,6	25,78 ± 37,9	28,55 ± 41,9	0,569	0,57
Granulicatella	1,50 ± 5,5	0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,05	0,417	0,66
Enterococcus	3,72 ± 7,4	4,52 ± 7,7	0,22 ± 0,3	0,518	0,60
Lactobacillus	0,15 ± 0,2	0,11 ± 0,3	3,35 ± 6,7	3,378	**0,05**[#]
Streptococcus	14,34 ± 21,3	2,00 ± 2,8	0,70 ± 0,6	2,038	0,15
Clostridium	0,55 ± 0,9	1,61 ± 2,3	0,87 ± 1,5	1,358	0,27
Lachnospiraceae	1,04 ± 1,7	0,03 ± 0,1	0,02 ± 0,05	1,946	0,16
Lachnospiraceae uncultured	0,44 ± 0,8	0,06 ± 0,2	0,02 ± 0,05	1,395	0,26
Veillonella	1,50 ± 3,2	5,95 ± 10,2	2,42 ± 4,8	1,447	0,25
Enterobacter	2,07 ± 2,5	3,76 ± 3,7	1,17 ± 2,1	1,390	0,26
Escherichia-Shigella	0,69 ± 1,0	4,45 ± 7,2	2,25 ± 2,7	2,481	0,10
Klebsiella	13,2 ± 15,8	20,21 ± 21,1	7,30 ±12,4	0,844	0,44
Serratia	0,35 ± 0,4	0,61 ± 0,8	23,02 ± 45,8	3,622	**0,04**[#]
Actinobacillus	0,52 ± 1,6	0,03 ± 0,1	0,02 ± 0,05	0,514	0,60
Haemophilus	1,33 ± 3,3	1,11 ± 2,0	0,07 ± 0,1	0,326	0,72
Acinetobacter	0,34 ± 0,6	0,32 ± 0,7	0,10 ± 0,2	0,264	0,77
Pseudomonas	0,92 ± 1,6	0,15 ± 0,2	0,05 ± 0,1	1,333	0,28
Stenotrophomonas	5,75 ± 12,1	0,03 ± 0,07	0,07 ± 0,09	1,269	0,29

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores de *P* são baseados no *GMM* e confirmados com o pós-teste Sidak. Só foram comparados gêneros que estavam presentes nos três grupos; [*]Diferença significativa entre o grupo Gastrosquise com o grupo Onfalocele; [#]Diferença significativa entre o grupo Gastrosquise com o grupo Atresia/hérnia; [£]Diferença significativa entre o grupo Onfalocele com o grupo Atresia / hérnia.

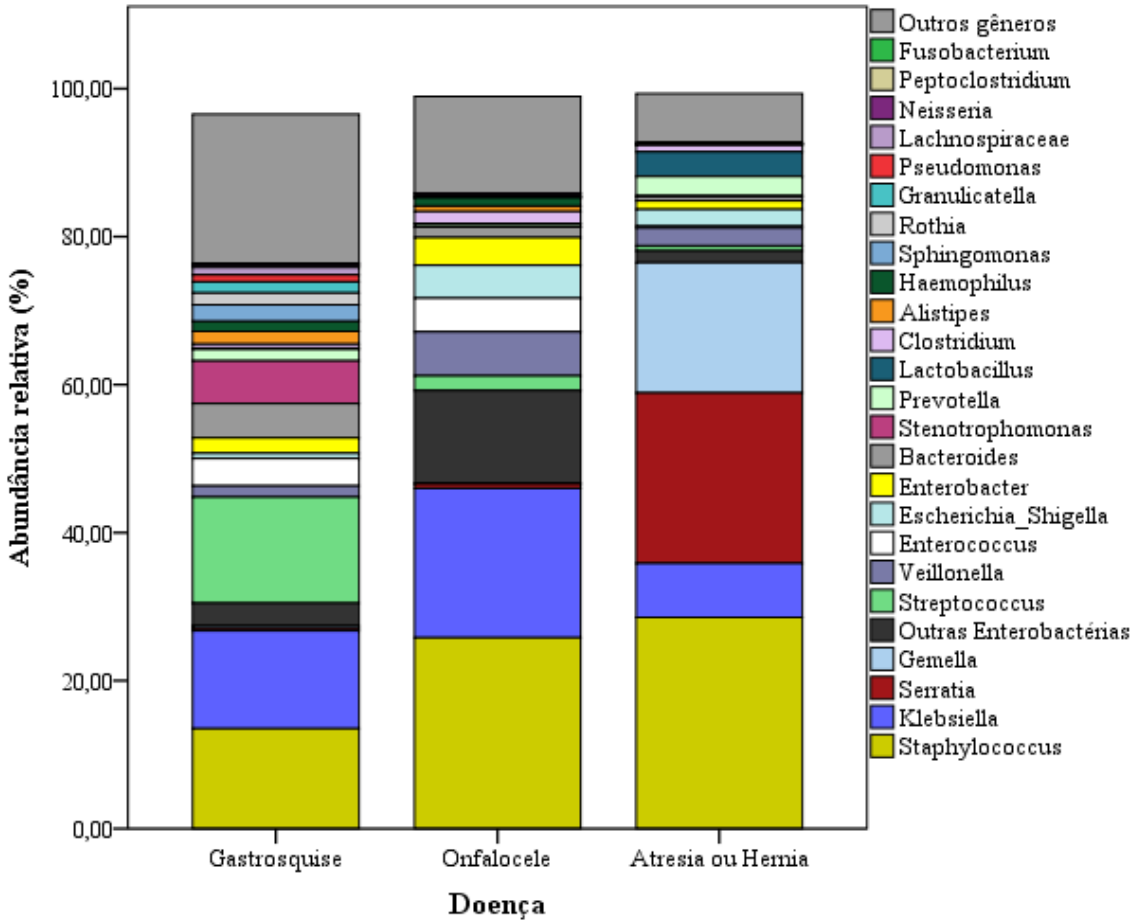

Figura 5- Principais gêneros observados no período basal

Uso de Antibioticoterapia

A porcentagem do uso de antibioticoterapia, nesta população, foi feita de acordo com as principais classes de antibióticos. Os resultados podem ser observados na Figura 6. A classe de antibiótico mais utilizado foi a dos Aminoglicosídeos (100%), seguido por antibióticos Beta-lactâmicos (96,67%), Glicopeptídeos (63,33%) e Carbapenêmicos (60%). As classes de antibióticos menos utilizadas por essa população foram as Sulfonamidas (3,33%) e as Quinolonas (3,33%).

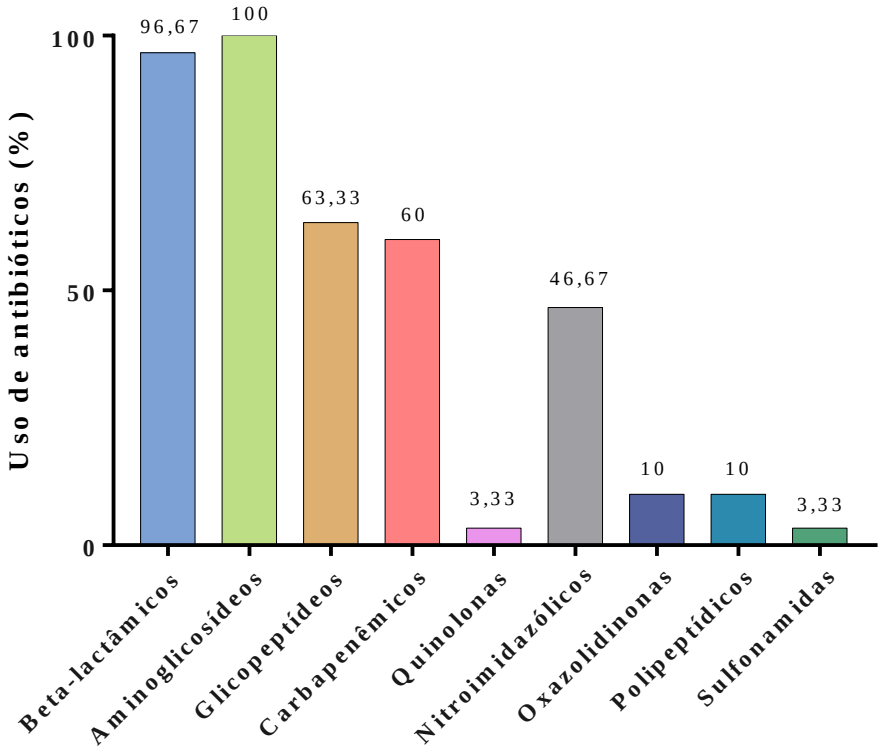

Figura 6- Porcentagem do uso de antibióticos durante a internação em RN com defeito congênito de parede abdominal

Número de Ciclos de Antibioticoterapia Durante a Internação

Com o objetivo de avaliar a associação do uso de vários ciclos de antibióticos durante o período de internação, dividimos a população entre RN que utilizaram mais de três ciclos de antibioticoterapia durante a internação e RN que utilizaram menos do que três ciclos, de acordo com a última amostra coletada antes da alta hospitalar. Recém-nascidos que só tiveram uma amostra coletada durante o período de internação, anterior ao uso dos ciclos de antibióticos, foram excluídos desta análise. A Tabela 4 apresenta a comparação dos principais filos encontrados. O filo *Proteobacteria* foi o mais abundante em ambos os grupos, com prevalência no grupo que recebeu mais

de três ciclos de antibióticos (66,63 ± 27,9) em comparação ao grupo que recebeu menos de três ciclos (57,48 ± 39,9), mas o resultado não apresentou significância estatística (p=0,53). Em contrapartida, o filo *Firmicutes* apresentou-se mais abundante no grupo que recebeu menos de três ciclos (37,25 ± 36,5), em comparação ao grupo que recebeu mais de três ciclos (24,51 ± 22,5), porém o resultado também não foi estatisticamente significante (p=0,33). O filo *Bacteroidetes* apresentou valores mais abundantes no grupo que recebeu mais de três ciclos e o filo *Actinobacteria* no grupo que recebeu menos de três ciclos, mas não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 4- Análise dos filos de acordo com o uso de antibioticoterapia

Filo	**Mais de 3 ciclos de antibiótico** (n=11)	**Menos de 3 ciclos de antibiótico** (n=12)	**Valor do teste**	***P***
Actinobacteria	0,67 ± 1,3	2,51 ± 5,4	1,195	0,28
Bacteroidetes	4,24 ± 6,5	2,44 ± 4,4	0,612	0,44
Firmicutes	24,51 ± 22,5	37,25 ± 36,5	0,988	0,33
Proteobacteria	66,63 ± 27,9	57,48 ± 39,9	0,398	0,53

Valores estão expressos em média ± desvio padrão. Valores de *P* são baseados no *General Mixed Model (GMM)* e confirmados com o pós-teste Sidak.

Em relação aos principais gêneros observados de acordo com o uso de antibioticoterapia, os resultados podem ser observados na Tabela 5 e nas Figuras 6 e 7. O gênero mais prevalente no grupo que recebeu mais de três ciclos de antibióticos foi *Klebsiella* (22,57 ± 23,9) e o gênero mais prevalente no grupo que recebeu menos de três ciclos foi *Escherichia-Shigella* (20,89 ± 36,3). Outros gêneros abundantes no grupo que recebeu mais de três ciclos, em

relação ao que recebeu menos de três ciclos, foram *Serratia* (8,40 ± 17,5), *Stenotrophomonas* (4,40 ± 9,1) e *Veillonella* (6,18 ± 19,3), porém os resultados não apresentaram significância estatística (p=0,15, p=0,11 e p=0,62, respectivamente). No grupo que recebeu menos de três ciclos, outros gêneros mais abundantes em relação ao outro grupo foram *Streptococcus* (14,92 ± 21,1) e *Enterococcus* (9,02 ± 24,7), mas os resultados também não alcançaram significância estatística (p=0,14 e p=0,29, respectivamente). O único gênero que apresentou diferença estatística entre os grupos nesta análise foi *Prevotella*, o qual se apresentou aumentado no grupo que recebeu mais de três ciclos (0,73 ± 1,1) em relação ao que recebeu menos de três ciclos (0,05 ± 0,1), p=0,03. Isto pode ser observado na Figura 8.

Tabela 5- Análise dos gêneros de acordo com o uso de antibioticoterapia

Gênero	**Mais de 3 ciclos de antibiótico** (n=11)	**Menos de 3 ciclos de antibiótico** (n=12)	**Valor do teste**	***P***
Bifidobacterium	0,03 ± 0,09	0,00 ± 0,02	1,001	0,32
Corynebacterium	0,03 ± 0,08	0,008 ± 0,02	1,269	0,27
Rothia	0,29 ± 0,7	2,30 ± 5,4	1,458	0,24
Bacteroides	0,58 ± 0,9	1,36 ± 3,5	0,521	0,47
Prevotella	0,73 ± 1,1	0,05 ± 0,1	4,846	**0,03***
Gemella	0,34 ± 0,9	0,30 ± 0,6	0,013	0,91
Staphylococcus	0,86 ± 2,0	2,21 ± 3,9	1,025	0,32
Granulicatella	0,64 ± 1,8	1,61 ± 5,3	0,330	0,57
Enterococcus	0,90 ± 0,9	9,02 ± 24,7	1,177	0,29
Lactobacillus	1,82 ± 5,9	0,008 ± 0,2	1,110	0,30
Streptococcus	4,26 ± 10,9	14,92 ± 21,1	2,242	0,14
Clostridium	1,16 ± 2,1	0,43 ± 0,9	1,229	0,28
Peptoclostridium	1,56 ± 4,0	4,04 ± 13,9	0,322	0,57
Veillonella	6,18 ± 19,3	3,19 ± 6,9	0,252	0,62
Fusobacterium	3,13 ± 10,3	0,02 ± 0,08	1,092	0,30
Shingomonas	0,13 ± 0,4	0,008 ± 0,02	0,962	0,33
Neisseria	0,02 ± 0,09	0,16 ± 0,5	0,625	0,43
Enterobacter	3,44 ± 3,1	3,29 ± 4,7	0,008	0,92
Escherichia-Shigella	8,11 ± 22,6	20,89 ± 36,3	1,004	0,32
Klebsiella	22,57 ± 23,9	19,03 ± 27,4	0,108	0,74
Serratia	8,40 ± 17,5	0,89 ± 0,9	2,189	0,15
Actinobacillus	1,37 ± 3,2	1,16 ± 3,7	0,020	0,88
Haemophilus	2,44 ± 5,9	4,79 ± 12,8	0,304	0,58
Acinetobacter	1,52 ± 4,7	0,01 ± 0,03	1,241	0,27
Pseudomonas	0,11 ± 0,3	0,008 ± 0,02	0,928	0,34
Stenotrophomonas	4,40 ± 9,1	0,05 ± 0,09	2,752	0,11

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores de P são baseados no GMM e confirmados com pós-teste Sidak; *Diferença significativa entre os grupos. Só foram comparados gêneros presentes em ambos os grupos.

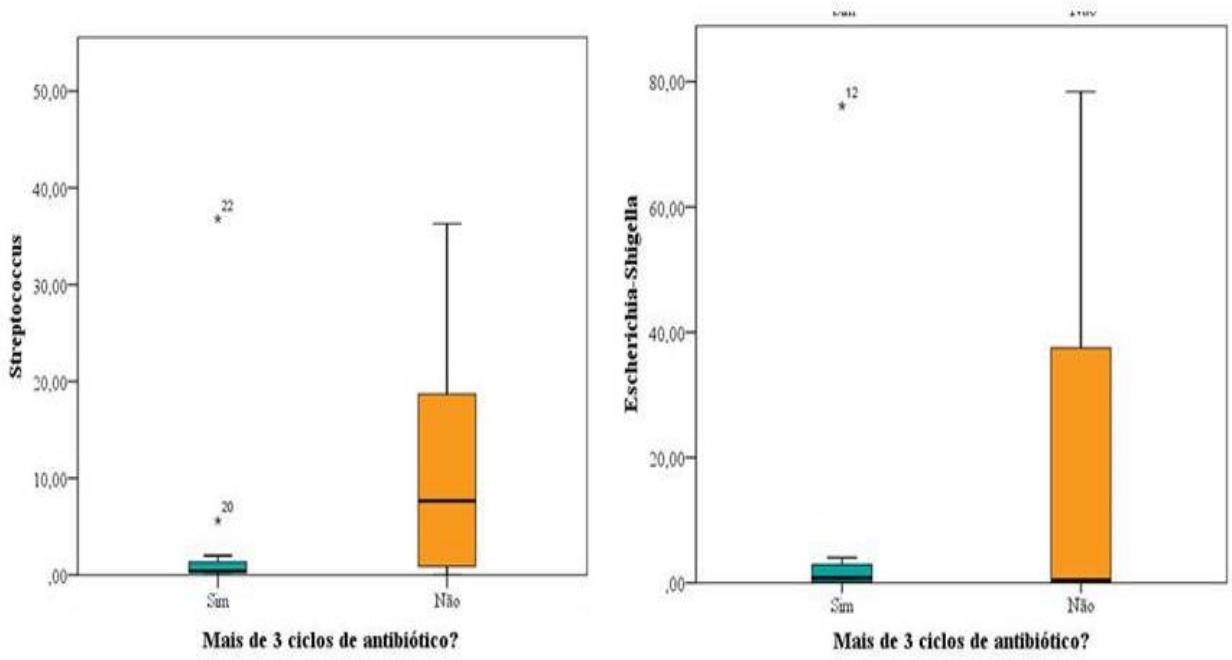

Figura 7- Gêneros bacterianos com maior diferença de acordo com o uso de mais de três ciclos de antibióticos

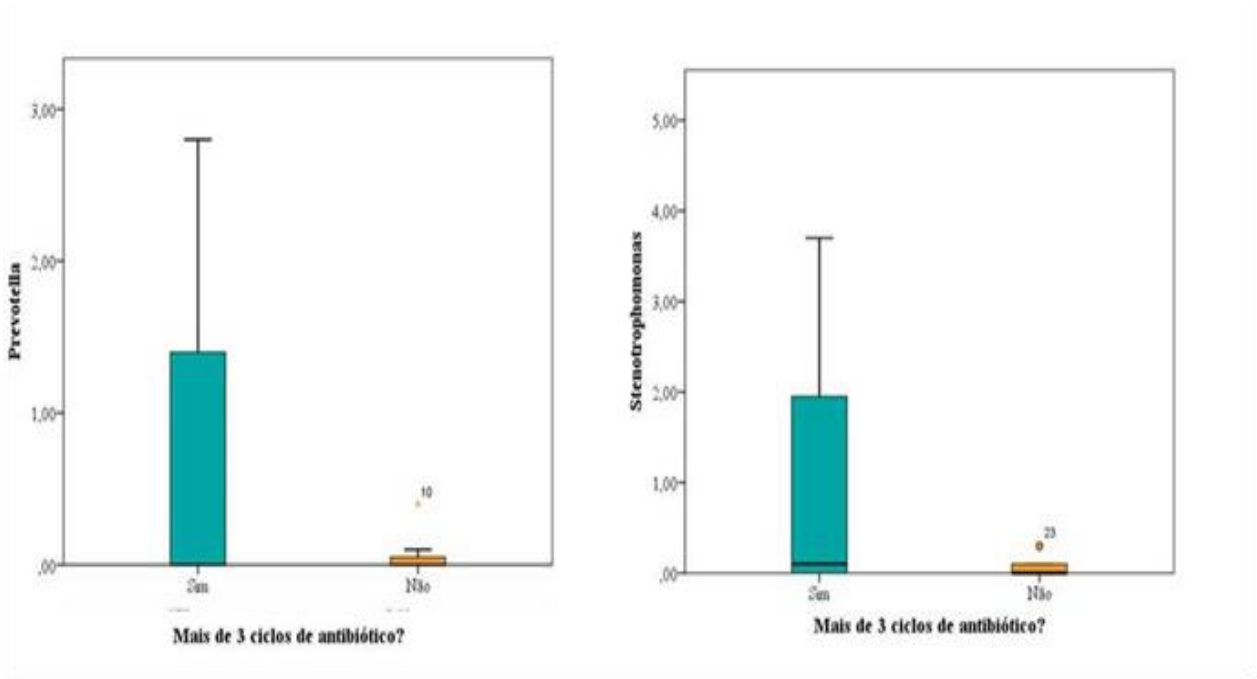

Figura 8- Gêneros bacterianos com maior diferença de acordo com o uso de mais de três ciclos de antibióticos

Ocorrência de Sepse

Para avaliar a associação entre a ocorrência de sepse e alterações na microbiota intestinal, dividimos os RN de acordo com a ocorrência de sepse durante a internação (houve ou não houve sepse), pela última amostra coletada antes da alta hospitalar. Os resultados em relação aos principais filos observados estão na Tabela 6. O filo mais abundante em ambos os grupos foi *Proteobacteria***,** com valores aumentados em RN que não apresentaram sepse (76,01 ± 30,43), com resultado apresentando tendência à significância (p=0,08). O segundo filo mais prevalente em ambos os grupos foi *Firmicutes*, com valor mais abundante no grupo que apresentou sepse (39,16 ± 31,23), porém o resultado não alcançou significância (p=0,15). Os demais filos, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes,* apresentaram-se aumentados no grupo que apresentou sepse (2,56 ± 5,20 e 3,95 ± 5,0, respectivamente) em relação ao grupo que não apresentou sepse, porém os resultados não foram estatisticamente significativos.

Tabela 6- Filos bacterianos de acordo com a ocorrência de sepse durante a internação

Filo	**Houve sepse** (n=13)	**Não houve sepse** (n=10)	**Valor do teste**	***P***
Actinobacteria	2,56 ± 5,20	0,43 ± 1,11	1,602	0,21
Bacteroidetes	3,95 ± 5,0	2,46 ± 6,19	0,410	0,52
Firmicutes	39,16 ± 31,23	20,77 ± 28,09	2,134	0,15
Proteobacteria	50,97 ± 34,10	76,01 ± 30,43	3,336	0,08

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores de *P* são baseados no *GMM* e confirmados com o pós-teste Sidak.

Os resultados em relação aos principais gêneros podem ser observados na Tabela 7. O gênero mais prevalente em ambos os grupos foi *Klebsiella*, com valor mais elevado no grupo que não apresentou sepse (28,81 ± 30,14) em relação ao grupo que apresentou sepse. O segundo gênero mais abundante em ambos os grupos foi *Escherichia-Shigella*, também com valores maiores no grupo que não apresentou sepse (17,57 ± 34,17), seguido por *Streptococcus*, o qual se apresentou mais abundante no grupo que apresentou sepse (12,60 ± 22,27) em relação ao grupo que não apresentou sepse (6,22 ± 8,01). *Enterococcus* (7,30 ± 23,45) e *Veillonella* (7,22 ± 18,37) também foram encontrados aumentados no grupo que apresentou sepse, em relação ao grupo que não apresentou (2,34 ± 6,51 e 1,24 ± 2,74, respectivamente). Em nenhum destes resultados foi observada significância estatística, assim como os demais resultados para gêneros nesta análise.

Tabela 7- Gêneros bacterianos de acordo com a ocorrência de sepse durante a internação

Gênero	**Houve sepse** (n=13)	**Não houve sepse** (n=10)	**Valor do teste**	***P***
Corynebacterium	0,03 ± 0,07	0,01 ± 0,03	0,668	0,42
Rothia	2,10 ± 5,23	0,35 ± 1,07	1,070	0,31
Bacteroides	1,31 ± 3,25	0,57 ± 1,32	0,462	0,50
Odoribacter	0,26 ±0,82	0,44 ± 1,39	0,147	0,70
Prevotella	0,47 ± 0,86	0,25 ± 0,75	0,433	0,51
Alistipes	0,23 ± 0,80	0,49 ± 1,54	0,256	0,61
Gemella	0,49 ± 0,99	0,14 ± 0,22	1,038	0,32
Staphylococcus	0,96 ± 1,94	2,35 ± 4,34	1,052	0,31
Granulicatella	2,00 ± 5,22	0,04 ± 0,09	1,402	0,25
Enterococcus	7,30 ± 23,45	2,34 ± 6,51	0,418	0,52
Streptococcus	12,60 ± 22,27	6,22 ± 8,01	0,740	0,39
Clostridium	0,99 ± 1,93	0,51 ± 1,00	0,511	0,48
Lachnospiraceae	0,24 ± 0,79	0,52 ± 1,64	0,278	0,60
Lachnospiraceae uncultured	0,16 ± 0,55	0,24 ± 0,75	0,083	0,77
Peptoclostridium	1,26 ± 3,74	4,92 ± 15,24	0,700	0,41
Veillonella	7,22 ± 18,37	1,24 ± 2,74	1,032	0,32
Shingomonas	0,11 ± 0,41	0,01 ± 0,03	0,632	0,43
Enterobacter	2,59 ± 3,33	4,37 ± 4,67	1,137	0,29
Escherichia-Shigella	12,63 ± 28,69	17,57 ± 34,17	0,142	0,71
Klebsiella	14,50 ± 19,91	28,81 ± 30,14	1,877	0,18
Serratia	3,49 ± 9,82	5,77 ± 15,77	0,181	0,67
Actinobacillus	1,24 ± 2,99	1,29 ± 4,07	0,001	0,97
Haemophilus	2,99 ± 5,70	4,55 ± 14,17	0,131	0,72
Acinetobacter	1,29 ± 4,33	0,02 ± 0,04	0,852	0,36
Stenotrophomonas	1,66 ± 4,74	2,75 ± 8,59	0,150	0,70

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores de *P* são baseados no *GMM* e confirmados com o pós-teste Sidak; *Diferença significativa entre os grupos; Só foram comparados gêneros que estavam presentes nos dois grupos

Tempo de uso de Nutrição Parenteral Prolongada (NPP)

Para observar a influência do tempo de recebimento da nutrição parenteral prolongada na microbiota intestinal dos RN incluídos neste estudo, foi realizado um teste de correlação entre o tempo de NPP e os principais filos e gêneros encontrados nas amostras. Os resultados dos testes de correlação com os principais filos encontrados estão disponíveis na Tabela 8. Para os filos *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* os resultados apresentaram uma tendência à significância, apresentando correlação positiva fraca com o uso de NPP (p=0,078 e p=0,098, respectivamente). Os demais filos não apresentaram valores significativos nos testes de correlação.

Tabela 8- Correlação entre os filos bacterianos e o tempo de NPP (n=25)

Filo		Tempo de NPP
Actinobacteria	Spearman [a]	0,359
	P	0,078
Bacteroidetes	Spearman [a]	0,338
	P	0,098
Firmicutes	Spearman [a]	0,069
	P	0,74
Proteobacteria	Spearman [a]	-0,130
	P	0,53

[a] Correlação de Spearman (*two-tailed*); *Significância observada *P*≤0,05.

Em relação aos principais gêneros encontrados, os resultados estão disponíveis na Tabela 9. Os gêneros que apresentaram significância estatística no teste de correlação foram *Lactobacillus* (p=0,014) e *Lachnospiraceae* (p=0,05), com correlação positiva fraca em relação ao uso de NPP. Outros gêneros, como *Alistipes*, *Odoribacter* e *Peptoclostridium*, apresentaram

tendência à correlação positiva fraca ao uso de NPP (p=0,051, p=0,072 e p=0,068, respectivamente). Os demais gêneros não apresentaram resultados significativos nos testes de correlação.

Tabela 9- Correlação entre os gêneros bacterianos e o tempo de NPP (n=25)

Gênero		**Tempo de NPP**
Odoribacter	Spearman [a]	0,366
	P	0,072
Alistipes	Spearman [a]	0,395
	P	0,051
Lactobacillus	Spearman [a]	0,485
	P	**0,014***
Lachnospiraceae	Spearman [a]	0,395
	P	**0,05***
Peptoclostridium	Spearman [a]	0,371
	P	0,068

Tempo de Jejum

Para avaliar a influência do tempo de jejum na microbiota intestinal dos RN deste estudo, foi realizado um teste de correlação entre o tempo de jejum e os principais filos e gêneros (Tabela 10).

Tabela 10- Correlação entre os filos bacterianos e o tempo de jejum (n=25)

Filo		Tempo de jejum
Actinobacteria	Spearman	0,199
	P	0,34
Bacteroidetes	Spearman	0,358
	P	0,07
Firmicutes	Spearman	0,045
	P	0,82
Proteobacteria	Spearman	-0,085
	P	0,68

[a] Correlação de Spearman (two-tailed); “Significância observada encontrados nas amostras

Os resultados dos testes de correlação com os principais filos encontrados estão disponíveis na Tabela 10. O filo Bacteroidetes apresentou uma tendência à correlação positiva fraca com o tempo de jejum (p=0,07), porém os demais filos não apresentaram resultados significativos neste teste.

Para os principais gêneros, os resultados podem ser observados na Tabela 11. Os gêneros que apresentaram correlação positiva fraca com o tempo de jejum nesta análise foram: *Odoribacter* (p=0,032), *Prevotella* (p=0,039), *Alistipes* (p=0,013), *Granulicatella* (p=0,032) e *Lachnospiraceae* (p=0,013); para o gênero *Enterococcus* (p=0,011) foi observada uma correlação positiva média. Outros gêneros apresentaram uma tendência à correlação positiva fraca com o tempo de jejum, como *Bacteroides* (p=0,066), *Lachnospiraceae* não cultiváveis (p=0,067) e *Acinetobacter* (p=0,081). Os demais gêneros bacterianos não apresentaram significância estatística.

Tabela 11- Correlação entre os gêneros bacterianos e o tempo de jejum (n=25)

Gênero		Tempo de jejum
Bacteroides	Spearman [a]	0,373
	P	0,066
Odoribacter	Spearman [a]	0,430
	P	**0,032***
Prevotella	Spearman [a]	0,416
	P	**0,039***
Alistipes	Spearman [a]	0,489
	P	**0,013***
Granulicatella	Spearman [a]	0,429
	P	**0,032***
Enterococcus	Spearman [a]	0,502
	P	**0,011***
Lachnospiraceae	Spearman [a]	0,488
	P	**0,013***
Lachnospiraceae ulcultured	Spearman [a]	0,372
	P	0,067
Acinetobacter	Spearman [a]	0,356
	P	0,081

[a]Correlação de Spearman (two-tailed); *Significância observada P≤0,05. Somente apresentados gêneros com resultados significativos.

7. DISCUSSÃO

A colonização microbiana do intestino humano afeta o metabolismo e a imunidade do hospedeiro. Embora muitos estudos relatam que ao nascimento as mucosas do recém-nascido estariam colonizadas por bactérias existentes intraútero (Funkhouser; Bordenstein, 2013), os mais recentes, como o de Kennedy et al. (2021), concluíram que a colonização do intestino fetal de RN a termo ocorre principalmente após o nascimento e que o perfil da microbiota do mecônio neonatal depende da idade gestacional, do meio ambiente e das condições clínicas do recém-nascido (Liu et al., 2021; Moreira et al., 2019).

No entanto, outras situações clínicas na UTI neonatal como a prematuridade e aquelas relacionados às malformações digestivas como gastrosquise, onfalocele, hérnia diafragmática e atresias intestinais têm maior incidência observada nos últimos anos.

A UTI Neonatal do Instituto da Criança (ICr) Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) é considerada como referência destes graves problemas, ou seja, admite recém-nascidos com malformações digestórias que frequentemente são submetidos às correções cirúrgicas precoces ocasionando: jejum prolongado, necessidade de expansões volumétricas, correção dos distúrbios hidroeletrolíticos, infusão de coloídes como albumina e NPP. Muitos necessitam drogas vasoativas, permanecem em ventilação mecânica convencional, ventilação de alta frequência e monitorização infecciosa conforme os protocolos do serviço que preza não somente a capacitação cirúrgica mas sobretudo o entendimento da questão clínica destas crianças, o que fez a diferença nos resultados positivos obtidos em conjunto entre a neonatologia e a cirurgia pediátrica.

Estes dados foram analisados por Redondo et al., (2016) em estudo clínico retrospectivo de 50 lactentes com gastrosquise admitidas neste serviço.

Os resultados demonstraram que a cirurgia inicial ocorreu com uma mediana de 2 horas, 14% das crianças foram submetidas a uma interposição de silo primário e 24% tiveram malformação intestinal associada. Dezenove RN necessitaram de mais de uma intervenção cirúrgica. Todos os RN recuperaram o débito urinário 48 horas após a cirurgia e 40% tiveram hiponatremia e oligoanúria neste período. Concluíram que a caracterização clínica de recém-nascidos com gastrosquise depende da complexidade dos casos, do conhecimento, da conduta inicial e das comorbidades que impactam a mortalidade.

No entanto, um dos maiores problemas destes RN está relacionado à disbiose intestinal. São inúmeros os fatores potenciais de disrupção do microbioma na UTI neonatal associados às malformações digestivas, em especial gastrosquise, desde o jejum prolongado, uso de nutrição parenteral, dificuldades na introdução da alimentação enteral ou ausência de substrato alimentar intestinal, uso de antibióticos e drogas vasoativas, inibidores de secreção gástrica como Omeprazol e sobretudo as resseções intestinais comuns na UTI Neonatal, além da colonização dos diversos microbiomas da criança pelo meio ambiente da UTI e a falta do aleitamento materno, que conduzem à grave disbiose intestinal, ou seja, um estado alterado da ecologia microbiana com intenso desequilíbrio da microbiota intestinal.

Estudos demostram que as alterações da microbiota intestinal em pacientes internados em UTI apresentam intensa proliferação de bactérias patogênicas oportunistas, redução da flora comensal constituída por

Lactobacillus e Bifidobacterias e diminuição significativa na diversidade da microbiota intestinal que podem levar à sepse endógena por translocação bacteriana intestinal e agravo da insuficiência intestinal (Liu et al., 2021; Rozë et al., 2020).

No entanto, não há muita informação sobre estudos relacionados às intervenções cirúrgicas gastrointestinais durante o período neonatal. A revisão sistemática da literatura revelou apenas dois ensaios clínicos randomizados realizados na Australia por Rao et al. (2018), o primeiro com 24 neonatos com gastrosquise e o segundo com oito neonatos com várias condições cirúrgicas.

Estes estudos apontam para o manejo clínico adequado logo após o nascimento com necessidade de balanço hidroeletrolítico e o preparo metabólico pré-cirurgia, como verificado no estudo de Redondo et al. (2016).

O início da colonização intestinal ocorre após o parto (Winther et al., 2020; Moron, 2020). No intestino, a população microbiana inicial é bastante heterogênea. Mecanismos regulatórios gerados dentro dos habitats (como imunidade e condições físico-químicas do meio) e fatores externos (tipos de nutrientes, contaminação ambiental, medicações e uso de antimicrobianos) condicionam à presença de alguns tipos de microrganismos patogênicos e à supressão de outros (Agostini, Mazzocchi, 2019; Alexandrova et al., 2019; Antosca et al., 2019; Chong et al., 2018; Koch, 2019; McLean et al., 2019; Nyangahu, 2019). Posteriormente, a composição da microbiota se torna mais estável, e a comunidade bacteriana normal do adulto é alcançada (comunidade clímax). As crianças atingirão uma microbiota com características de adulto ou comunidade clímax em torno dos 18 meses de idade. A partir deste período, embora a microbiota intestinal permaneça em interação permanente com

microrganismos do meio ambiente, sua composição se mantém estável (Lee et al., 2018; Penders et al., 2007).

Os RN, principalmente aqueles que permanecem por muito tempo na UTI Neonatal, são altamente suscetíveis às alterações na microbiota intestinal. Um dos aspectos importantes e com consequências no período pós-cirúrgico destas crianças é a *disbiose intestinal* devido aos fatores associados à doença anteriormente mencionados, o que ocasiona a disrupção do microbioma intestinal na terapia intensiva neonatal, levando à grave disbiose intestinal, que comumente levam à insuficiência intestinal e dificuldades na adaptação intestinal ao longo do período da internação.

O microbioma intestinal destes pacientes na UTI neonatal sofre muitas alterações em função desses disruptores, ocorrendo diminuição da microbiota comensal de bactérias como *lactobacilos e bífidobactérias* que modulam a imunologia intestinal na produção de anticorpos e a defesa, ocasionando a permeabilidade intestinal às bactérias patogênicas que podem translocar através da mucosa intestinal, com a presença de patógenos oportunistas altamente resistentes aos antibióticos e que podem ter translocação bacteriana intestinal e modificação acentuada nos filos bacterianos com predomínio das *proteobacterias*, que são bactérias patogênicas altamente resistentes aos antibióticos e que podem causar infecções de gravidade na UTI neonatal e pediátrica.

Por outro lado, há uma diminuição da camada de muco e diminuição na produção dos ácidos graxos de cadeia curta, ocasionando desintegração do epitélio da mucosa intestinal, aumento de permeabilidade intestinal e da resposta inflamatória imunológica, muitas vezes com a presença de diarreia e

diminuição da absorção de nutrientes. Assim, a disbiose intestinal é uma característica importante e grave que ocorre nas UTI neonatais e pediátricas (Tiffon, 2018; Paparo, 2016).

Devido às considerações acima e gravidade do problema decidimos realizar o estudo da microbiota intestinal, no qual foram incluídos trinta recém-nascidos com malformações do trato gastrointestinal e da parede abdominal, com especial ênfase em onfalocele e gastrosquise.

Os dados demográficos da nossa casuística estão representados na figura1: no grupo de recém-nascidos com *gastrosquise* a maioria era do sexo masculino (66,7%) e o nascimento por parto cesáreo (72,2%). No grupo com *onfalocele*, observou-se a porcentagem igual de recém-nascidos em relação ao sexo e todos nasceram de parto cesáreo e idade gestacional de termo. No grupo com atresia ou hérnia, a maior parte era do sexo masculino (75%) e nascidos de parto vaginal. Comparando com o estudo de Redondo et al. 2016 com cinquenta RN internados no mesmo centro neonatal com diagnóstico de gastrosquise não houve diferença em relação ao sexo: feminino (26 casos) e masculino (24 casos). A idade gestacional e o peso médio ao nascimento foi de 36 e 1/7 semanas e 2.306 g, respectivamente. Do total de 43 gestantes (86%) através de parto cesáreo e 77% primíparas. A mediana de idade do RN na admissão hospitalar para correção cirúrgica foi de 2 horas e máximo de 6 dias.

Na sequência (Tabela 1) verifica-se o tempo médio de internação no grupo com gastrosquise foi de 75,5 ± 67,4 dias, superior ao observado no grupo com onfalocele (48,5 ± 42,9) e no grupo com atresia / hérnia (43,7 ± 21,6). O mesmo foi observado no tempo de nutrição parenteral (NPP): o grupo com gastrosquise recebeu NPP por 49,8 ± 31,3 dias, enquanto o grupo com

onfalocele recebeu NPP por uma média de 28,6 ± 28,9 dias e o grupo com atresia ou hérnia por uma média de 35,5 ± 19,7 dias.

Com referência ao gráfico 3, observa-se que o ganho de peso semanal dos pacientes foi prejudicado pelas complicações e comorbidades, ao passo que no trabalho de Redondo et al. (2016) o ganho de peso foi semelhante em ambos os grupos que receberam nutrição parenteral e foi significativamente maior em pacientes com gastrosquise após alimentação enteral (p = 0,0046). Os RN que apresentaram nutrição enteral mais precoce e em maior quantidade evoluíram com 2,4 vezes menos colestase.

A análise dos principais filos e gêneros observados com a primeira amostra de cada recém-nascido foi realizada, utilizando a primeira amostra coletada de cada RN, independentemente da semana de vida. Estudando a composição da microbiota intestinal dos RN em condições basais verificamos nas Tabelas 2 e 3 e figuras 4 e 5 que o filo mais abundante foi *Firmicutes*, com prevalência no grupo com atresia / hérnia (59,4 ± 45,3). O segundo filo mais abundante foi *Proteobacteria*, com maior prevalência no grupo com onfalocele (44,7 ± 38,2).

Em relação aos principais gêneros observados entre os grupos ao nascimento, os resultados podem ser observados na Tabela 3. O principal gênero observado no grupo com onfalocele e no grupo com atresia / hérnia foi *Staphylococcus* (25,78 ± 37,9 e 28,55 ± 41,9, respectivamente), o qual foi o segundo mais abundante no grupo com gastrosquise (13,50 ± 28,6). O gênero mais abundante no grupo com gastrosquise foi *Streptococcus* (14,34 ± 21,3), porém estes resultados não apresentaram significância estatística. Outros gêneros abundantes nos grupos foram *Gemella*, o qual estava

significativamente maior no grupo atresia/hérnia (17,61 ± 35,2) em relação ao grupo com gastrosquise (0,32 ± 0,7) – p=0,04; o gênero *Lactobacillus*, encontrado significativamente maior no grupo atresia/hérnia (3,35 ± 6,7) em relação ao grupo com gastrosquise (0,15 ± 0,2) – p=0,05 e o gênero *Serratia*, que apresentou abundância significativamente maior no grupo atresia / hérnia (23,02 ± 45,8) em relação ao grupo com gastrosquise (0,35 ± 0,4) – p=0,04. As demais comparações de gêneros entre os grupos não apresentaram significância estatística. Os resultados desta análise podem ser observados na Tabela 3 e na Figura 5.

O estudo realizado por Taddei e Feferbaum em 2016 na mesma UTI Neonatal demonstra o panorama (ou “foto”) do microbioma intestinal realizado no mesmo dia de crianças cirúrgicas internadas (Figura 2 do anexo).

Neste estudo, os principais filos encontrados foram *Firmicutes*, *Proteobactérias, Bacteroidetes* e *Actinobacteria* (Figura 3 do anexo). A proporção relativa de bactérias na microbiota intestinal está representada (Figura 4 do anexo). A diferença com nossos resultados foi no compartilhamento da microbiota da UTI Neonatal destas 11 crianças onde se encontraram 18 gêneros bacterianos, sendo os mais abundantes: *Enterobacteria, Acinetobacter, Streptococcus, Stenotrophomonas, Enterococcus, Streptococcus* sp. (Figura 1 do anexo).

Assim, verifica-se a falta de diversidade bacteriana destas crianças que demandam internação prolongada em UTI Neonatal, submetidas ao estresse cirúrgico, terapêutica antimicrobiana, jejum prolongado e nutrição parenteral por tempo prolongado.

A semelhança com nosso estudo seria a prevalência dos filos *Firmicutes* e *Proteinobacterias* na microbiota basal destas crianças e a predominância do gênero *Streptococccus* em todos os grupos, ao passo que são menos frequentes os *Lactobacillus* e *Serratia*. Denota-se a diferença com o trabalho de Taddei e Feferbaum, com menor diversidade bacteriana da microbiota, a ausência dos filos *Bacteroidetes* e *Actinobacterias* e a prevalência em todos os grupos do gênero *Gemella*.

Quando comparamos nossa casuística com o desenvolvimento da microbiota intestinal de crianças nascidas a termo, em aleitamento materno, nascidas de parto vaginal e cesariana com o estudo de Pan et al. (2021), que realizaram sequenciamento de amostras de fezes do gene que codifica o rRNA 16S de 82 recém-nascidos com três e 30-42 dias verificou-se que nas amostras dos neonatos de três dias os gêneros *Bifidobacterium, Lactobacillus* e *Bacteroides* foram mais proeminentes no parto vaginal do que no grupo de cesariana, que apresentou predominância de *Staphylococcus, Streptococcus* e *Corynebacterium* . As diferenças entre os dois grupos foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Nas amostras de lactentes de 30 a 42 dias, *Bifidobacterium, Lactobacillus, Escherichia-Shigella* e *Bacteroides* foram os principais gêneros presentes no grupo de parto vaginal, enquanto no grupo de parto cesáreo os gêneros predominantes foram *Escherichia-Shigella, Bifidobacterium, Bacteroides* e *Staphylococcus*.

No nosso estudo descrevemos a composição microbiana do início da vida, que é muito diferente dessas crianças; na literatura não temos nenhum estudo semelhante.

Alterações da microbiota intestinal em pacientes sépticos exibem proliferação de bactérias patogênicas oportunistas e uma redução importante da flora saprofita, uma diminuição significativa na diversidade da microbiota intestinal que configura a disbiose intestinal em concordância. Os estudos de Moreira (2019); Taddei e Feferbaum (2016) mostraram que durante a internação pode-se ter uma colonização anômala pelo uso de antibióticos.

Verifica-se nas Tabelas 4 e 5 a análise dos filos e dos gêneros bacterianos que demonstraram menor diversidade nos pacientes que utilizaram mais de três ciclos de antibióticos durante a internação; a ocorrência de sepse foi em 50% das gastrosquises e de 62.5% na onfalocele.

O filo *Proteobacteria* foi o mais abundante em ambos os grupos, com prevalência no grupo que recebeu mais de três ciclos de antibióticos; em contrapartida, o filo *Firmicutes* apresentou-se mais abundante no grupo que recebeu menos de três ciclos. O filo *Bacteroidetes* apresentou valores mais abundantes no grupo que recebeu mais de três ciclos e o filo *Actinobacteria* no grupo que recebeu menos de três ciclos, mas não houve diferença significativa entre os grupos.

Em nosso estudo com relação à ocorrência de sepse o filo mais abundante em ambos os grupos (que apresentou sepse e não apresentou sepse) foi *Proteobacteria***,** com valores aumentados em recém-nascidos que não apresentaram sepse. O segundo filo mais prevalente em ambos os grupos foi *Firmicutes*, com valor mais abundante no grupo que apresentou sepse. Os demais filos, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, apresentaram-se aumentados no grupo que apresentou sepse, como verificado na Tabela 6.

Mai et al. (2011) observaram que, antes do diagnóstico de Enterocolite Necrosante, bactérias do filo *Proteobacteria*, como as *enterobactérias*, estiveram em baixas proporções nas fezes de neonatos pré-termo, quando comparadas ao grupo controle. Em contrapartida, observou-se elevada proporção destas bactérias após o diagnóstico, o que sugere que a ausência de exposição/colonização por *Proteobacteria* na primeira semana de vida pode comprometer a modulação da resposta imunológica adaptativa, frente a um subsequente aumento desta população.

Como exemplos individuais Taddei e Feferbaum (2016), descreveram a microbiota de um recém-nascido pré-termo (RNPT) com idade gestacional de 26 semanas que desenvolveu ECN (Figura 5 do anexo). Descreveram também a microbiota de uma criança com gastrosquise, na qual foi identificado na hemocultura *Staphylococcus epidermidis Oxacilina Resistente* (Figura 6 do anexo).

A infecção adquirida (nosocomial) em ambiente hospitalar é primariamente um problema para os prematuros e para aqueles recém-nascidos de termo com disfunções médicas que exigem hospitalização prolongada. Os recém-nascidos de termo saudáveis têm taxas de infecção < 1%. Para neonatos em berçários de cuidados especiais a incidência aumenta à medida que o peso de nascimento diminui. As infecções nosocomiais mais comuns são infecções associadas a cateter venoso central e as infecções cutâneas por *Staphylococcus Aureus* (tanto sensível como resistente à Meticilina). Embora os profissionais da UTI Neonatal que são transportadores do *Staphylococcus Aureus* nasal sejam fontes potenciais da infecção, são os neonatos e as mães colonizadas que funcionam como

reservatórios. O coto umbilical, nariz e virilha são frequentemente colonizados durante os primeiros dias de vida. Com frequência, a infecção se manifesta após alta da UTI Neonatal.

Nos RN com muito baixo peso ao nascimento (RNMBPN; < 1.500 g) e outras patologias, como malformações, os organismos Gram-positivos, a maioria *Estaphylococcus coagulase-negativos*, causam cerca de 70% das infecções. Os organismos Gram-negativos, incluindo *Escherichia coli, Klebsiella, Pseudomonas, Enterobacter e Serratia*, são responsáveis por cerca de 20% delas. As micoses (*Candida albicans e Candida. parapsilosis*) causam aproximadamente 10% das infecções. Os padrões de infecção (e resistência aos antibióticos) variam com as instituições e as unidades e mudam com o tempo. “Epidemias” intermitentes ocorrem às vezes e um organismo particularmente virulento coloniza uma unidade. A infecção é facilitada por múltiplos procedimentos invasivos a que se submetem os recém-nascidos com malformações e outras patologias (p. ex., cateterismo arterial e venoso mantido por muito tempo, entubação endotraqueal, pressão positiva contínua das vias respiratórias, alimentação por sondas nasogástricas ou nasojejunais). Quanto maior a permanência em UTI e quanto mais procedimentos executados, maior é a possibilidade de infecções.

Os resultados em relação aos principais gêneros podem ser observados na Tabela 7. O gênero mais prevalente em ambos os grupos foi *Klebsiella*, com valor mais elevado no grupo que não apresentou sepse (28,81 ± 30,14) em relação ao grupo que apresentou sepse. O segundo gênero mais abundante em ambos os grupos foi *Escherichia-Shigella*, também com valores maiores no grupo que não apresentou sepse (17,57 ± 34,17), seguido por *Streptococcus*, o

qual se apresentou mais abundante no grupo que apresentou sepse (12,60 ± 22,27) em relação ao grupo que não apresentou sepse (6,22 ± 8,01). *Enterococcus* (7,30 ± 23,45) e *Veillonella* (7,22 ± 18,37) também foram encontrados aumentados no grupo que apresentou sepse, em relação ao grupo que não apresentou (2,34 ± 6,51 e 1,24 ± 2,74, respectivamente). Em nenhum destes resultados foi observada significância estatística, assim como os demais resultados para gêneros nesta análise. Em nosso trabalho demonstramos que gêneros potencialmente patogênicos foram dominantes na microbiota intestinal da maioria das crianças.

Esses dados foram encontrados em outros estudos com recém-nascidos pré-termo e críticos (Moreira et al., 2019). A predominância de gêneros de bactérias potencialmente patogênicas na microbiota intestinal de bebês cirúrgicos, encontrados neste estudo, são fatores de risco para a ocorrência de sepse e outras intercorrências clínicas. Aqui mostramos a presença de bacilos gram-negativos não fermentadores, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*, como membros dominantes do microbioma intestinal e sua presença no diagnóstico de sepse, sugerindo que a translocação do intestino para a corrente sanguínea pode estar relacionada à ocorrência de sepse. No nosso estudo, em condições basais o filo mais abundante nos grupos foi *Firmicutes*, com prevalência no grupo com atresia / hérnia. O segundo filo mais abundante foi *Proteobacteria*, com maior prevalência no grupo com onfalocele. Em relação aos principais gêneros observados entre os grupos ao nascimento, o principal gênero observado no grupo com onfalocele e no grupo com atresia/hérnia foi *Staphylococcus*, o qual foi o segundo mais abundante no

grupo com gastrosquise. O gênero mais abundante no grupo com gastrosquise foi *Streptococcus.*

Liu et al. em 2021, no estudo caso-controle comparando 20 pacientes e 20 crianças saudáveis através da análise taxonômica da microbiota intestinal do sequenciamento do gene 16S rRNA demonstrou que a diversidade da microbiota intestinal em crianças com sepse foi significativamente reduzida em comparação com crianças saudáveis. Desta forma a composição da microbiota intestinal pode distinguir crianças com sepse de crianças saudáveis.

No mesmo estudo demonstraram que alterações da microbiota no intestino de pacientes sépticos foram correlacionados positivamente com indicadores de inflamação do sangue PCR e alterações infecciosas no leucograma. Ainda, a abundância de sete bactérias foi significativamente diminuída em crianças sépticas em comparação com as crianças saudáveis. A diminuição das *Bifidobacterias* no intestino de pacientes sépticos foi significativamente correlacionada com o leucograma nestes pacientes, concluindo-se que o conhecimento da composição da microbiota intestinal tem certo potencial para o diagnóstico de sepse correlacionado com diminuição da quantidade e supressão do número de bactérias.

Com o objetivo de avaliar a associação do uso de vários ciclos de antibióticos durante o período de internação, pelos resultados observados na Figura 6 verifica-se que a porcentagem do uso de antibioticoterapia, nesta população, foi feita de acordo com as principais classes de antibióticos. A classe de antibiótico mais utilizado foi a dos Aminoglicosídeos (100%), seguido por antibióticos Beta-lactâmicos (96,67%), Glicopeptídeos (63,33%) e

Carbapenêmicos (60%). As classes de antibióticos menos utilizadas por essa população foram as Sulfonamidas (3,33%) e as Quinolonas (3,33%).

Quando dividimos a população entre recém-nascidos que utilizaram mais de três ciclos de antibioticoterapia durante a internação verifica-se, na Tabela 4, que apresenta a comparação dos principais filos encontrados de acordo ao uso de antibioticoterapia, que o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante em ambos os grupos, com prevalência no grupo que recebeu mais de três ciclos de antibióticos (66,63 ± 27,9) em comparação ao grupo que recebeu menos de três ciclos (57,48 ± 39,9), porém sem significância estatística (p=0,53). Em contrapartida, o filo *Firmicutes* apresentou-se mais abundante no grupo que recebeu menos de três ciclos (37,25 ± 36,5), em comparação ao grupo que recebeu mais de três ciclos (24,51 ± 22,5), porém o resultado também não foi estatisticamente significante (p=0,33). O filo *Bacteroidetes* apresentou valores mais abundantes no grupo que recebeu mais de três ciclos e o filo *Actinobacteria* no grupo que recebeu menos de três ciclos, mas não houve diferença significativa entre os grupos.

Bresesti et al. (2022) referem que a composição da microbiota intestinal neonatal é afetada pelo tempo, duração e tipo de exposição ao antibiótico. A profilaxia antibiótica intraparto está associada a uma diversidade diminuída e a *lactobacilos e bifidobactérias* mais diminuídos no intestino neonatal. Da mesma forma, a diminuição do gênero *Bifidobacterium* também foi demonstrada após o uso de antibióticos pós-natais em bebês prematuros.

Diferentes antibióticos foram encontrados para influenciar a variedade de espécies da microbiota intestinal. Gilbert et al. (2018) demonstraram que Meropenem, Cefotaxima e Ticarcilina-clavulanato foram significativamente

associados à redução da diversidade da microbiota intestinal, enquanto a Ampicilina, Vancomicina e Gentamicina não foram. Eles também encontraram um risco aumentado para oportunistas e dominância de bactérias patogênicas após o tratamento com antibióticos. Outro estudo realizado por Angelo et al., em 2019 demonstrou também o impacto negativo do uso dos antibióticos na formação do microbioma humano.

Em relação aos principais gêneros observados de acordo com o uso de antibioticoterapia, os resultados podem ser observados na Tabela 5 e na Figura 7. O gênero mais prevalente no grupo que recebeu mais de três ciclos de antibióticos foi *Klebsiella* (22,57 ± 23,9) e o gênero mais prevalente no grupo que recebeu menos de três ciclos foi *Escherichia-Shigella* (20,89 ± 36,3). Outros gêneros abundantes no grupo que recebeu mais de três ciclos, em relação ao que recebeu menos de três ciclos, foram *Serratia* (8,40 ± 17,5), *Stenotrophomonas* (4,40 ± 9,1) e *Veillonella* (6,18 ± 19,3), porém os resultados não apresentaram significância estatística (p=0,15, p=0,11 e p=0,62, respectivamente). No grupo que recebeu menos de três ciclos, outros gêneros mais abundantes em relação ao outro grupo foram *Streptococcus* (14,92 ± 21,1) e *Enterococcus* (9,02 ± 24,7), sem significância estatística (p=0,14 e p=0,29, respectivamente). O único gênero que apresentou diferença estatística entre os grupos nesta análise foi *Prevotella*, o qual se apresentou aumentado no grupo que recebeu mais de três ciclos (0,73 ± 1,1) em relação ao que recebeu menos de três ciclos (0,05 ± 0,1), p=0,03, como observado na Figura 8.

Estudos com neonatos a termo ressaltam o impacto significativo da utilização de antibióticos durante o período neonatal. Brandt et al. (2012)

observaram redução de bactérias anaeróbicas e *Escherichia* e aumento de *Klebsiella* em neonatos que receberam antibioticoterapia por dez dias comparados com o grupo de neonatos sem antibiótico. Tanaka et al. (2009) sugerem que a microbiota apresenta a tendência de restaurar-se após o período de tratamento com antibióticos, porém com a possibilidade de que algumas alterações sejam permanentes. Taddei et al. (2014) verificaram que a alteração da microbiota após o uso de antibiótico é interdependente e que o leite materno parece ajudar a resiliência da microbiota frente à administração de antibióticos (Carvalho-Ramos, 2015).

Para observar a influência do período de *recebimento da nutrição parenteral prolongada* na microbiota intestinal dos RN incluídos neste estudo, foi realizado um teste de correlação entre o tempo de NPP e os principais filos e gêneros encontrados nas amostras. Os resultados dos testes de correlação com os principais filos encontrados estão disponíveis na Tabela 8. Para os filos *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, os resultados apresentaram uma tendência à significância, apresentando correlação positiva fraca com o uso de NPP (p=0,078 e p=0,098, respectivamente). Os demais filos não apresentaram valores significativos nos testes de correlação.

Neste contexto, em nosso estudo o *tempo de jejum médio* observado também foi maior no grupo com gastrosquise (60,4 ± 90,2 dias), em relação ao grupo com onfalocele (13,1 ± 7,4) e o grupo com atresia / hérnia (28,2 ± 18,8). Todos os grupos apresentaram altas taxas de sepse, sendo de 50% no grupo com gastrosquise, 62,5% no grupo com onfalocele e 75% no grupo com atresia/hérnia.

As bactérias mais prevalentes identificadas foram *Streptococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Streptococcus pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*, o que nos mostra a conotação clínica da modificação do microbioma humano em vigência da sepse (Tabela 7).

O tempo de *reabilitação intestinal com início da dieta enteral* foi de um mês em 19 pacientes, de dois meses em quatro pacientes, de três meses ou mais em quatro pacientes e em três casos não houve reabilitação, denotando a dificuldade na adaptação intestinal destas crianças cirúrgicas muito provavelmente devido à disbiose intestinal decorrente de todos os fatores já analisados

Yatsunenko et al. (2012) e Taddei e Feferbaum (2016) corroboram os nossos resultados ao concluírem que a falta de aleitamento materno, a administração de antibióticos e a influência do ambiente hospitalar e de longa internação podem explicar a baixa diversidade da microbiota intestinal em neonatos e a ausência de bactérias simbióticas como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, com predomínio de bactérias patogênicas como *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas*. Esses resultados podem contribuir para o entendimento de como a microbiota intestinal de neonatos gravemente doentes se desenvolve sob a influência do meio ambiente e da alimentação na composição da microbiota fecal, sugerindo intervenções mais adequadas relacionadas ao controle da disbiose intestinal.

Finalizando, o que se propõe para a terapêutica da disbiose intestinal do recém-nascido? Propõe-se justamente a melhora do meio microbiano intestinal, ou seja, passar da disbiose para uma certa eubiose através do uso de pró e prebióticos, que são o alimento das bactérias, principalmente essas bactérias

que ocasionam uma melhor imunomodulação do sistema imunitário intestinal, e o eventual uso de probióticos que podem colonizar de uma forma positiva esse intestino e com isso termos uma competição e inibição dessas bactérias patogênicas, além da modulação do tecido linfoide intestinal, melhorando as suas condições imunológicas.

O alimento ideal para fornecimento de bióticos é o leite humano da própria mãe ou do Banco de Leite Humano (BLH).

Como exemplo, uma ação comum atualmente para RN pré-termos na prevenção da enterocolite necrosante é o uso da colostroterapia, com resultados favoráveis na diminuição da ECN no estágio de Bell acima de 2 e da sepse, além de melhora da aceitação e progressão da dieta, atingindo a dieta enteral plena em menor tempo. Com a colostroterapia, crianças que recebem colostro nas primeiras horas de vida evoluem com aumento nos níveis das Imunoglobulinas como IgA, IgG e IgM.

Wydau-Dematteis et al. (2022), comparando colostroterapia entre colostro cru da própria mãe e colostro pasteurizado do Banco de Leite Humano (BLH), concluíram que ambos demonstraram maior diversidade microbiana mesmo com colostro pasteurizado, havendo níveis de *lactobacilos e bifidobacterium* bastante apreciáveis com esse último. Portanto, o uso precoce da dieta enteral teria desfechos bastante favoráveis, mostrando que tanto o uso do colostro cru como do colostro pasteurizado tem efeitos benéficos na diminuição de uso de antibióticos, no tempo de uso da nutrição parenteral, na ocorrência de sepse e no tempo de internação na terapia intensiva neonatal.

Analisando os dados do mesmo grupo multicêntrico de pesquisas do microbioma intestinal em RN pré-termos, Taddei e Feferbaum et al. (2016)

estudaram a evolução da colonização da microbiota fecal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia: foram estudados 33 RN internados na UTI neonatal submetidos à colostroterapia, apenas um deles com colostro materno cru e os demais com colostro pasteurizado. A oferta de colostro instalado diretamente na orofaringe, nas primeiras 24 horas de vida com intervalo a cada três horas demonstrou nas semanas subsequentes à internação presença dos *phylum* bacterianos: *Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria*, *Bacteroidetes, Actinobacteria.*

Zhang et al. (2017) confirmam os benefícios da colostroterapia com menor incidência de ECN e de sepse neonatal em RNPT dos submetidos à colostroterapia comparados com grupo de controle e aumento do tempo de aleitamento materno exclusivo nos pós-alta.

Nosso estudo tem a finalidade do reconhecimento e gravidade da disbiose intestinal no RN com malformações gastrointestinais submetido à correção cirúrgica. A exemplo da prematuridade, a proposta de tratar a grave disbiose que prejudica a adaptação intestinal destes RN seria através da modulação imunológica intestinal, corrigindo a disbiose através dos prescrição de bióticos e sobretudo do leite humano. Porém, mais estudos serão necessários para atingir este objetivo.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Malformações digestivas em RN são de alta complexidade clínica e terapêutica;
2. As intervenções cirúrgicas e consequentes alterações clínicas ocasionando jejum prolongado, sepse e uso de antibioticoterapia e nutrição parenteral prolongada conduzem à grave disbiose intestinal, com predominância de filos bacterianos constituídos por gêneros de bactérias altamente patogênicas;
3. O reconhecimento da disbiose intestinal nas malformações gastrointestinais do RN é de fundamental importância para possíveis alternativas terapêuticas;
4. O leite humano cru ou do BLH pode ser uma alternativa interessante como conduta terapêutica no controle da disbiose intestinal nestes RN.

9. ANEXOS

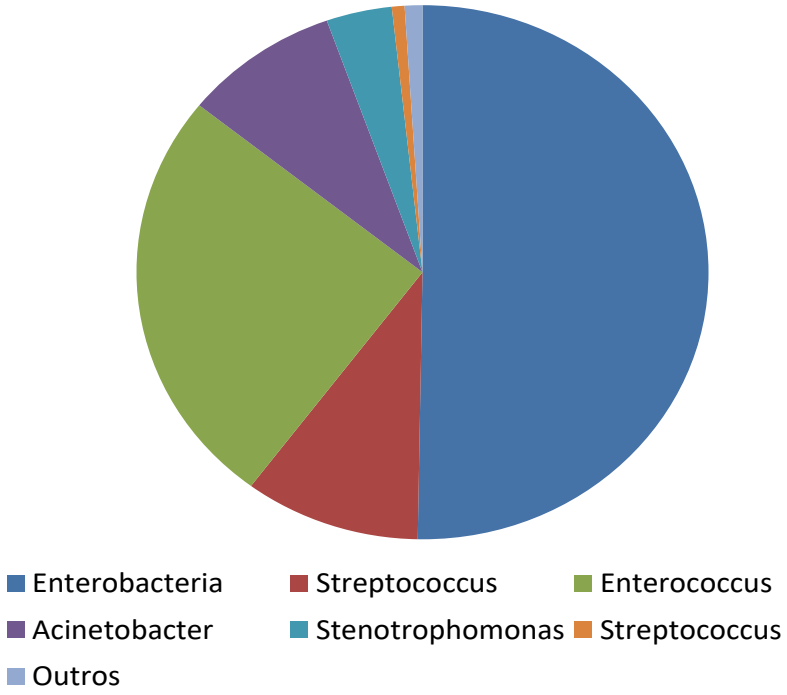

Figura 1. Compartilhamento da microbiota na UTI Neonatal (n=11). 18 gêneros foram encontrados em todas as crianças do estudo, sendo estes os mais abundantes (Taddei; Feferbaum, 2016).

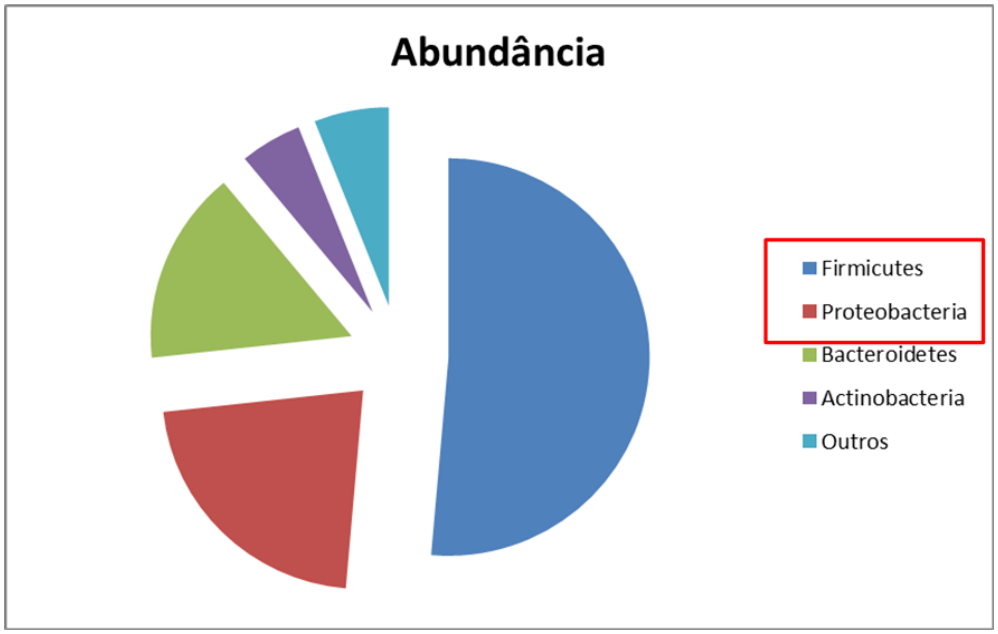

Figura 2. Panorama da UTI Neonatal Filos (Taddei; Feferbaum, 2016).

Firmicutes	*Roseburia* *Faecalibacterium* *Clostridium* *Streptotoccus* *Staphylococcus* *Enterococcus*	
Proteobacteria	Enterobacterias –	*Escherichia* *Klebsiella* *Enterobacter*
	Não Fermentadores -	*Acinetobacter* *Stenotrophomonas*
Bacteroidetes	*Bacteroides* *Prevotella*	
Actinobacteria	*Bifidobacterium*	

Figura 3. Filos Principais representantes (Taddei; Feferbaum, 2016).

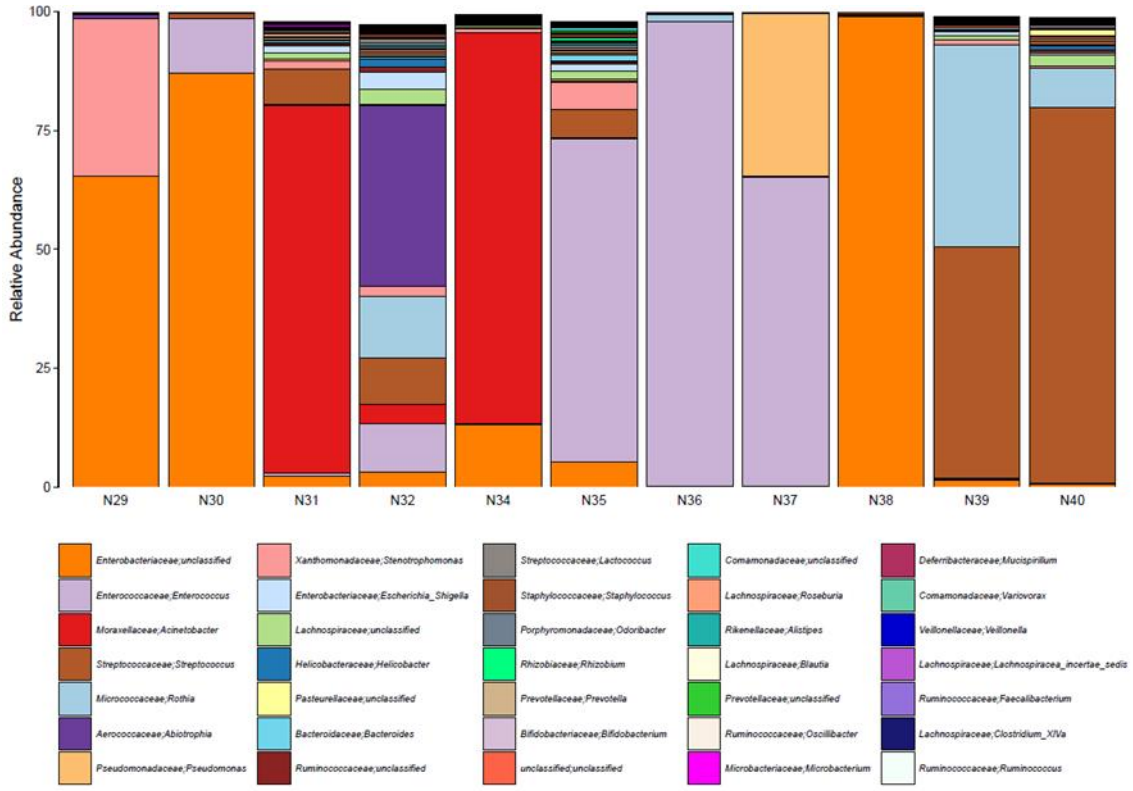

Figura 4. Proporção Relativa de Bactérias na Microbiota Intestinal de Crianças na UTI Neonatal (n=11) (Taddei; Feferbaum, 2016).

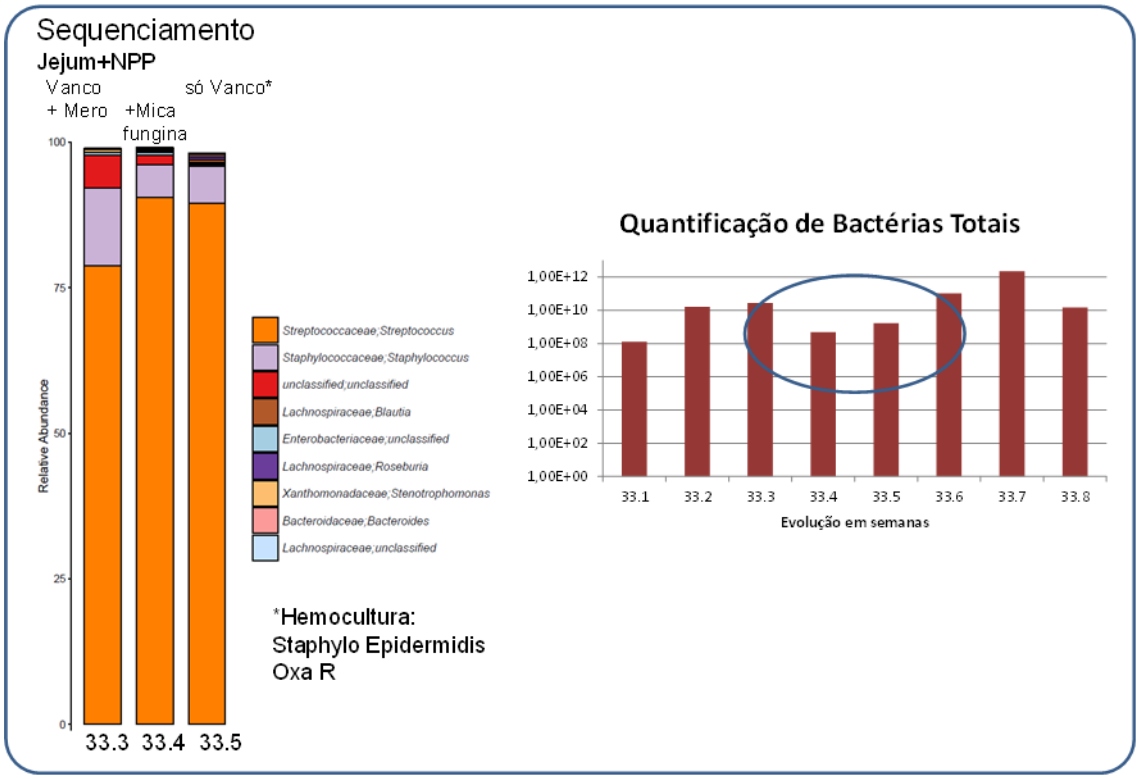

Figura 5. Neonato 33 – RNPT IG 26 sem-Enterocolite necrosante. (Taddei; Feferbaum, 2016).

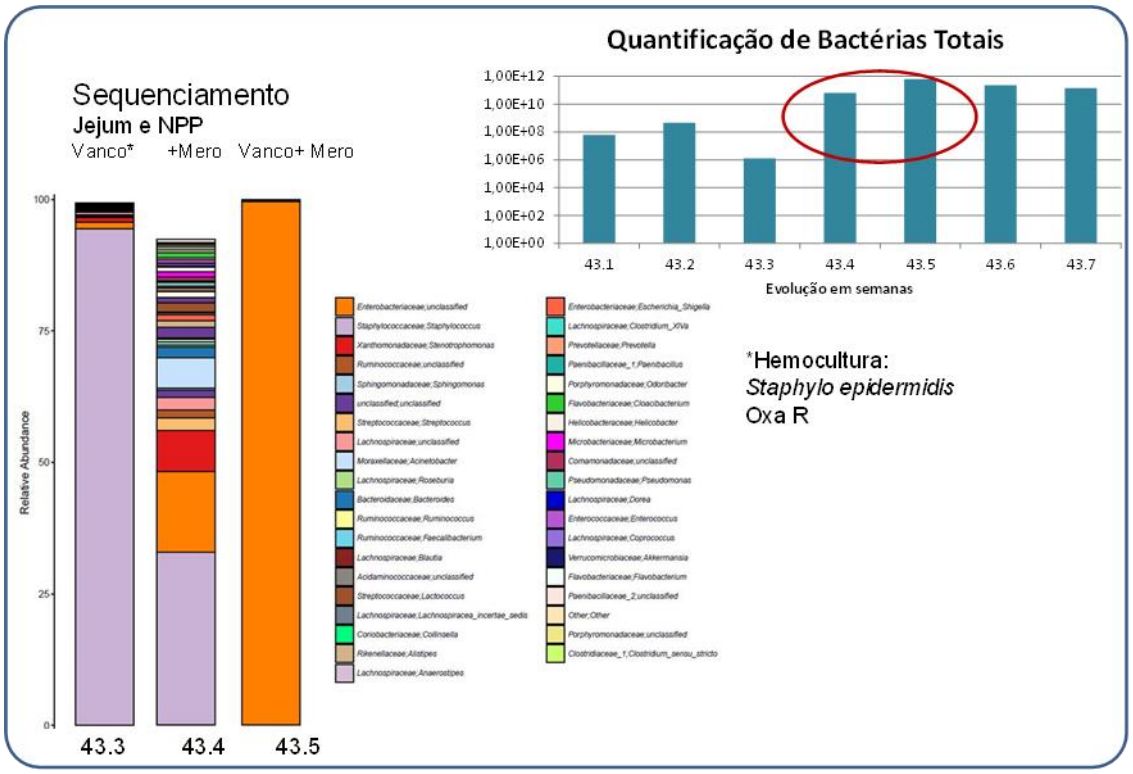

Figura 6. Neonato 43- RN – Gastrosquise (Taddei; Feferbaum, 2016).

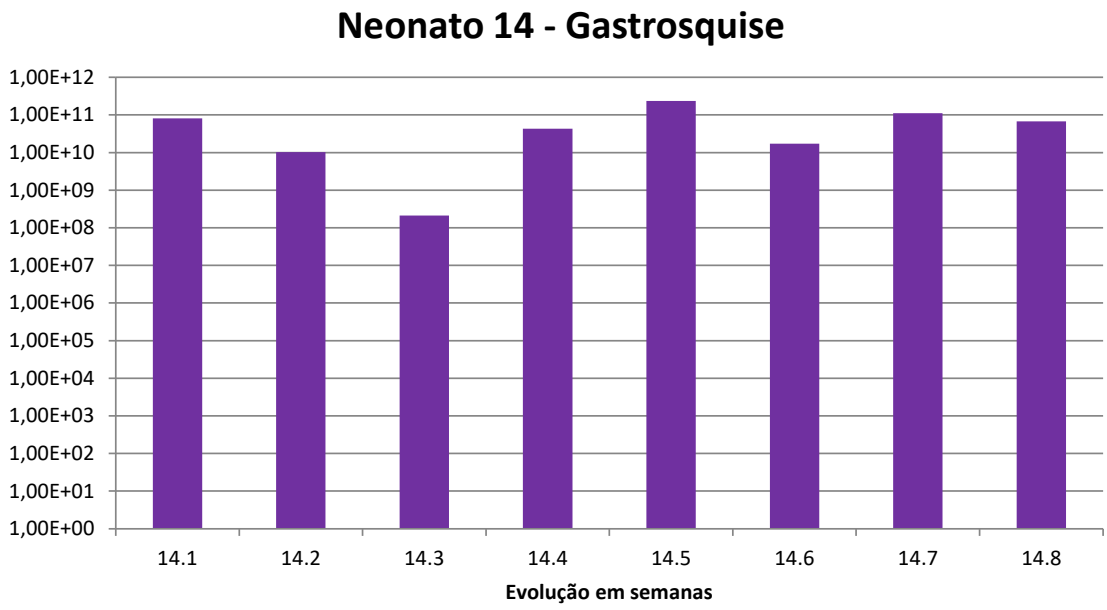

Figura 7. Evolução da Colonização Intestinal – Bactérias Totais – Neonato 14 – Gastrosquise (Taddei; Feferbaum, 2016).

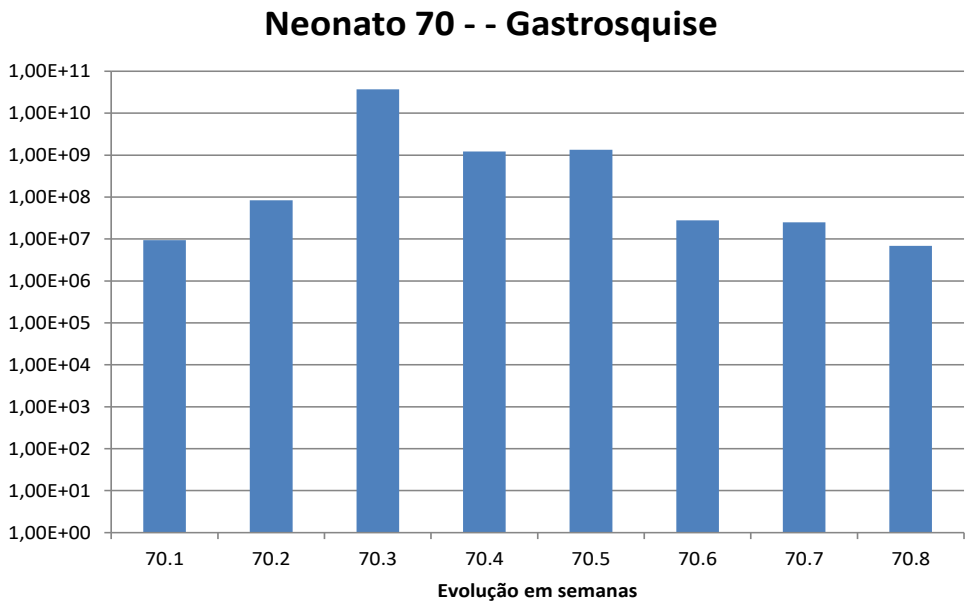

Figura 8. Evolução da Colonização intestinal - Bactérias Totais - Neonato 70 – Gastrosquise (Taddei; Feferbaum, 2016).

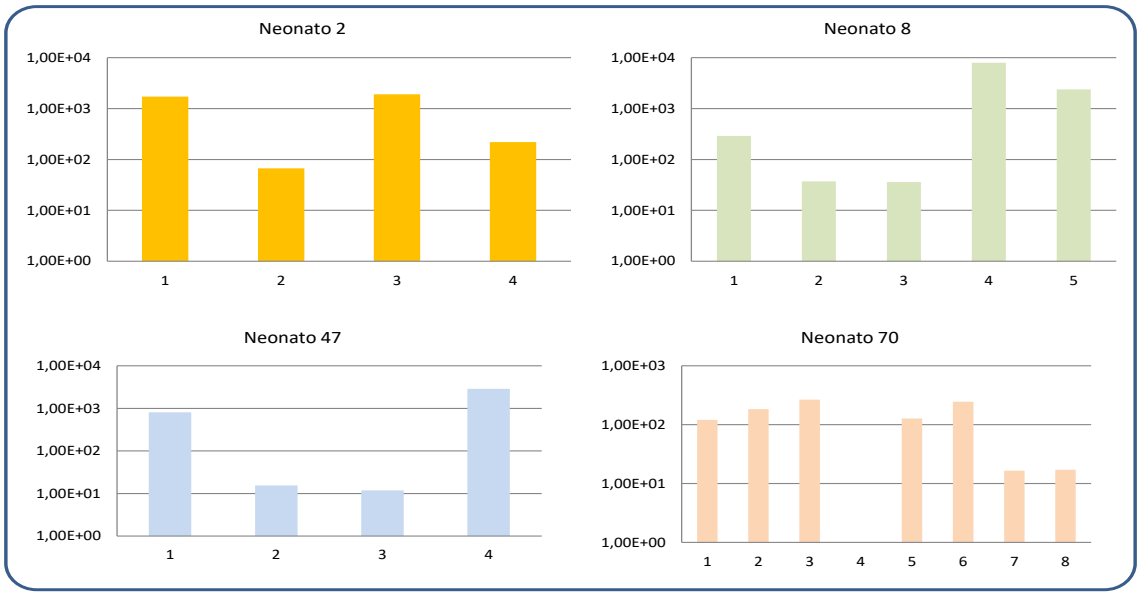

Figura 9. Evolução da Colonização Intestinal - Quantificação de Lactobacillus - 2,8,47,70- Gastrosquise (Taddei; Feferbaum, 2016).

Tabela 1. Gênero, nascimento, alta (*óbito), Peso de Nascimento (PN), tempo de internação (dias), tipo de parto, Idade gestacional (IG) e Apgar (N=30)

Caso	Gênero	Nascimento	Alta	PN (g)	Internação (dias)	Parto	IG	Apgar
1	M	11/01/2015	05/03/2015	1420g	53	Cesárea	32 5/7	07/08/2009
2	M	08/02/2015	17/03/2015	2430g	37	Cesárea	37 2/7	06/10/2010
3	M	02/01/2015	18/03/2015	3370g	75	Cesárea	37	07/08/2010
4	M	30/01/2015	03/03/2015	2910g	32	Cesárea	38 2/7	09/10/2010
5	M	07/02/2015	12/03/2015	3080g	33	Natural	38 sem DUM e 37 2/7 USG	07/ago
6	M	03/02/2015	04/04/2015*	1460g	60	Cesárea	32	01/04/2007
7	M	31/01/2015	05/03/2015	3490g	33	Forceps	38 2/7	01/06/2010
8	M	25/11/2014	04/03/2015	3200g	99	Cesárea	39 1/7	07/09/2010
9	M	15/10/2014	20/02/2015	3200g	128	Cesárea	38 2/7	05/07/2008
10	F	17/02/215	30/03/2015	3000g	41	Cesárea	38 sem DUM e 37 2/7 USG	08/08/2010
11	F	06/02/2015	26/03/2015	2200g	48	Cesárea	36 1/7	02/07/2009
12	F	09/03/2015	18/03/2015	2580g	9	Cesárea	38 3/7 DUM 38 5/7 USG	08/set
13	M	11/03/2015	22/07/2015	2015g	133	Cesárea	34 5/7	08/09/2010
14	M	16/03/2015	03/08/2015	1465g	140	Cesárea	34 5/7	06/08/2010
15	M	30/03/2015	14/06/2015	2425g	76	Cesarea	36 4/7	09/10/2010
16	F	30/03/2015	22/05/2015	4310g	53	cesarea	37 1/7	09/10/2010
17	M	22/04/2015	06/05/2015*	2500g	14	Cesareo	38 3/7	03/07/2008
18	M	03/05/2105	03/06/2015	2510g	4	Natural	34 2/7	09/10/2010
19	M	22/05/2015	29/06/2015	2435g	38	Cesarea	36 semanas	08/09/2010
20	M	26/05/2015	01/07/2015	2350g	36	Natural	35	09/10/2010
21	M	08/06/20215	16/07/2015	1750g	38	Natural	34	10/10/2010
22	F	26/06/2015	01/08/2015	2690g	36	Cesarea	37	09/10/2010
23	F	18/08/2015	23/02/2016	2290g	189	Cesarea	34 3/7 sem	06/09/2009
24	M	29/08/2015 (adm16/09/15)	16/05/2016*	3615g	261	Natural	38 semanas	09/10/2010
25	F	16/09/2015	08/10/2015	3330g	22	Cesarea	38	09/10/2010
26	F	03/10/2015	09/10/2015	2500g	6	Cesarea	37 1/7	08/09/2010
27	F	09/10/2015	28/10/2015	2360g	19	Cesarea	36 6/7	09/10/2010
28	F	20/10/2015	20/11/2015	2100g	31	Cesárea	38 2/7	09/09/2009
29	M	25/10/2015	24/02/2016	2190g	122	Natural	33 4/7	07/08/2008
30	F	22/11/2015	22/12/2015	2455g	30	Natural	35 5/7	09/09/2009

Tabela 2. Diagnóstico e intercorrências

Caso	Diagnóstico	Intercorrências
1	Gastrosquise / prematuro / risco de 107erifér 107eriféric / sepse neo tardia 107eriféric / hernia rafia inguinal 107eriféric (04/03) / hemorragia cranial grau 1 e colestase	Sofrimento fetal, RNPT, NIG, IMBP
2	Gastrosquise / criptorquidia bilateral	Sofrimento fetal agudo, RNT, PIG, hemorragia por SOG (27/02) recebendo Hemacias, 28/02 recebeu vitamina K e omeprazol. Criptorquidea bilateral.
3	Gastrosquise/pretermo/hernia inguinal direita/celulite parede abdominal	Mãe com anemia falciforme e 107eriférica, Sepse neonatal tardia presumida, pneumonia aspirativa, vicio de rotação, sepse tardia por S. epidermidis, polidrame, taquicardia fetal, infecção ITU presumida.
4	Onfalocele/atresia de ileo	Termo, onfalo, artesia de 107eri, percistencia de canal arterial, forame oval patente, sepse neonatal tardia e acidose 107eriférica. Convulsao neonatal, sofrimento fetal
5	Hernia diafragmática congenital	Convulsao, miclonias, 107eriféric, FOP, granuloma de ferida 107eriférica, RGE. Pai com gastrosquise. (11/02) correção da hernia.
6	Gastrosquise / prematuro	Necrose de cerca de 90% do delgado Obito
7	Gastrosquise, AIG, asfixia prenatal, anemia, FOP.	31/01 cirurgia. 02/02 foi para UCINE.
8	Onfalocele integra, sepse tardia, ITU, hernia rafia bilateral, hidrocefalia.	Convulsão, insulficiencia 107eriférica107o, fenda palatina, mãe toxoplasmose (+).
9	Onfalocele.	17/10 correção de onfalocele.
10	Gastrosquise	HIC GRAU I// COLESTASE// SEPSE NEONATAL TARDIA
11	Gastrosquise / prematuro	Sepse Neonatal Tardia; Onfalite; ITU por E Coli; Conjuntivite por S. Epidermidis
12	Onfalocele	Ictericia Neonatal
13	Gastrosquise/atresia jejuno terminal/Colon Hipoplasico	Atresia de 107eri, percistencia de canal arterial, forame oval patente, Ileite 107erifér (ileostomia);sepse neonatal tardia (varias), Colon Hipoplasico; Estenose de Piloro; Trombo em Atrio Direito; Quilotórax â Direita drenado
14	Gastrosquise/pre termo	Sepse Neonatal Taardia sem Meninigite; Perfuraqçao de Jejuno Bloqueado; Jejunectomia e enteroanastomse Jejunojejunal/ Colestase
15	Atresia de Jejuno, Pre termo Tardio AIG, Sepse Neonatal, Sepse relacionada a cateter	Hiponatremia, hipocalcemia; Sepse Neonatal Tardia; Sepse relacionada a cateter
16	Onfalocele, cardiopatia, macroglossia	Cardiopatia Congênita, Hipoglicemia,Acidose Metabolica, Sepse Neonatal Tardia,
17	Onfalocele, Cardiopatia Congenita(Hipoplasia de VE, CoAo)	Desconforto respiratório precoce;
18	Gastrosquise / prematuro	CIA/ FOP/ Sepse Neonatal Tardia
19	Gastrosquise PT Tardio AIG	Trombo em 107erif Direito; Colestase;
20	Atresia Ileal, PT Tardio AIG BP	Desconforto 107eriférica107o adaptativo resolvido; Risco de 107eriféric meconial; Mosaicismo Discreto em acomp com a Genetica
21	Gastrosquise / prematuro	Desconforto 107eriférica107o precoce resolvido; Criptorquidea a Esquerda; Broncodisplasia Pulmonar; Taquicardia Supraventricular; Anemia
22	Gastroquise	Desconforto Respiratòrio Precoce Resolvido; Anemia
23	Gastrosquise, Intestino Curto	Ileo prolongado; Sepses 107eriféric; Choque Septico em varia socasioes; Parada Cardiorespiratória revertida
24	Volvo de intestino jejuno e 107eri com perfuração intestinal, Septiccemia, encefalopatia.	Sepse/Ruptura da anastomose/Reop/Ictericia 107eriférica107/Abscesso d ecornea bialteal/Imunodeficiëncia
25	Onfalocele Gigante, T AIG, FM Hipotiroidis	Sem 107eriférica107o nem intercorrencias
26	Gastrosquise, Insuf Renal Aguda	Fasciculaçao de 107erifé por Hipocalcemia;Sd. Compartimental no Poi de 107eriféri de Gastrosquise
27	Gastrosquise	Oligoanuria e anasarca no Poi; Hipertrofia de clitoris; Hiponatremia;
28	Onfalocele; T-PIG-BP; Cardiopatia Congenita;	Sepse Neonatal Tardia Resolvida; Sepse Presumida; Insuficiencia Renal Aguda; Hipoglicemia refrataria,; Atelectasia em HTD
29	Gastrosquise, atresia, 107eriféric.	Desconforto 107eriférica107o precoce; Atresia Intestinal; Hemorragia ntestinal, Sepse Neonatal; urosepse; Fmae adolescente
30	Atresia de Jejuno, Ptardio PIG, Sepse,,INN	Ictericia Neonatal por IMF ABO; Foramen Oval Patente

Tabela 3. Dias de NPP, tipo e início de dieta enteral

Caso	Dias de NPP	Tipo de dieta enteral	Início de Dieta Enteral
1	Até 20/02/2015	LMO ou FH (Hidrolisado)apòs Seio e alta com SM e FLT	18/02/2015
2	Até 16/03/2015	SM (seio)ou FLT via oral	12/03/2015
3	Até 15/03/2015	SM (seio)ou FH via oral 108eriféric para FLT para alta	07/03/2015
4	Até 26/02/2015	LMO ou FH (Hidrolisado)apòs Seio e alta com SM e FLT	20/02/2015, em 26/02 FLT desde 02/03 SM E FLT
5	12/02-03/03/2015	FLT 24/02 não tolerou susp em 25/02//27/02 FH aceitou//SM e FH 01/03// 03/03 VO e FLT	24-25/02/2015 (tentativa); 27/02/2015.
6	24/03 suspensa por agravamento	Não teve dieta enteral	Não iniciou
7	Até 02/03/2015	26/02 FH// 01/03 SM// 03/03 FLT alta com SM e FLT	26/02/2015
8	Até 21/12/2014	01/01/15 FH ou LMO// 09/01 FLT ou SM	16/12/2014 inicia e suspende em 24/12/2014. 20/01/2015 volta.
9	De 15/10/14 até 21/01/15.	FH 01/01/15//SM/ FLT	26/10/2014-11/01/2015; 16/01/2015
10	Até 16/03/15	11/03 SM ou FH// 14/03 SM ou FLT	16/03/2015
11	Até 19/03/15	18/03 SM e FH; 22/03 SM e FLT	19/03/2015
12	Até 16/03/15	13/03 FLT; 14/03 LMO ou FH; 16/03 Sm ou FLT	14/03/2015
13	Atè 09/07/15	01/06 FH/LMO susp em 01/06; FH iniciada e susp em 24/06; FH reiniciada em 27/06 tolerou; SM em 28/06 e trocada FH para FLT em 29/06; Leite desnatada iniciada em 03/07 acrescentado Maltodextrina 3% e TCM3% em 04/07; trocada a FH em 13/07 e FLTe SMLD em 17/07.	
14	Atè 02/06/15 / depois do 04/07 a 15/07	LMO/FH e depois SM e FLT	02/06/15 susp em 13/07 e reiniciada com sucesso em 15/07/2015
15	Até 02/06/15	FH/LMO 23/05;SM 26/05; FLT 02/06	06 e19/05 sem sucesso; 23/05
16	Até 24/04/15	LMO ou FLT 18/04	18/04/2015
17	Até o obito	Não recebeu	Não foi alimentado
18	Até 28/05/2015	FLT e Seio Materno	22/05/2015
19	Atè 17/06/2015	FLTem 13/06/ SM 18/06	13/06/2015
20	Até 26/06/15 (1 mês)	LMO/FH 24/06; SM28/06 e FLT 29/06/15	24/06/2015
21	Até 26/06/15 (18 dias)	LMO/FH 21/06; FLT 29/06 e SM 02/07/15.	21/06/2015
22	Até 29/07/15 (33 dias)	LMO/FH 20/07; FL sem lactose 22/07; LMO /SM 26/07.	20/07/2015
23	Ainda recebe no Hops dia Int curto	Dieta oral a partir do 1º ano	29/08/2016
24	16/09 a 16/10/15//24/10 a 23/11/15// 28/11 a 11/03/2016) até 23/11 suspensa por piora do quadro	Tentado no inicioSeio e FH// LMO e FLT sem sucesso// Formula Hidrolisada sem sucesso	16/10/15 Seio e FH sem sucesso susp 16/10/15// 21/10 a 22/10 FLT// Seio, LMO, FLT tentado d e23/10 a 26/10/15//LMO e FLT 09/01 a 10/01/15// Tentado FH em 05/3. Em 30/03 sem sucesso// 31/03 a 04/04 FH// FH de 07/04 a 08/04/16//FH de 26/04 a 27/04/16//
25	Até 04/10/2015	SM/LMO/FLT 28/09	28/09/2015
26	Mantida)transferida ao Hosp de origem)	Não recebeu	Não recebeu
27	15dias (10/10 a 25/10.	Aleitamento materno	25/10/2015
28	Até 03/11/2015	LMO/FH; SM em 02/11; FLT 07/11	.23/10/2015
29	21/01/2016; 05/11 suspendeu um dia.	FH 14/01/16; Seio Materno/Nan AR 28/01/16	14/01/2016
30	Até 20/12/2015	SM/ FLT em 02/12/2015	02/12/2015

Tabela 4. Tipo de antibiótico, sepse (sim ou não)

Caso	Antibióticos	Sepse
1	Ampicilina, Amicacina, Cefotaxima, Vancomicina, Menopenem	Sim
2	Ampicilina, Amicacina, Metronidazol.	Não
3	Ampicilina, Amicacina, Metronidazol, Vancomicina, Menopenem, Ceftriaxona.	Sim
4	Ampicilina, Amicacina, Metronidazol, Vancomicina, Meropenem.	Sim
5	Penicilina, Gentamicina, Ampicilina, Amicacina.	Não
6	Ampicilina, Amicacina, Metronidazol, Cefotaxima, Vancomicina, Meropenem, Micafungina, Levofloxacina.	Não
7	Ampicilina, Amicacina, Metronidazol, Cefotaxima.	Não
8	Vancomicina, Menoperem, Amicacina, Micafungina, Nilezonida, Polimixina B, Ampicilina.	Sim
9	Ampicilina, Amicacina, Vancomicina, Meropenem, Pipetazo.	Sim
10	Penicilina, Amicacina, Oxacilina, Vanco, Meropenem, Teicoplamina.	Sim
11	Ampicilina, Amicacina, Vancomicina, Menopenem.	Não
12	Penicilina, Gentamicina.	Não
13	Ampicilina, Amicacina, Meropenem, Vancomicina, Linesolida, Fluconazol.	Sim
14	Penicilina, Amicacina,Vancomicina, Cefotaxima, Meropenem.	Sim
15	Ampiclina, Gentamicina, Metronidazol, Amicacina, Vancomicina, Meropenem.	Sim
16	Ampicilina, Gentamicina, Metronidazol, Vancomicina, Meropenem.	Não
17	Ampicilina, Gentamicina, Vancomicina, Meropenem, Pipetazo.	Não
18	Ampicilina, Gentamicina, Vancomicina, Cefepime.	Sim
19	Ampicilina, Gentamicina, Vancomicina, Meropenem.	Sim
20	Ampicilina, Amicacina, Metronidazol.	Não
21	Ampicilina, Metronidazol, Amicacina, Cefotaxima.	Não
22	Ampicilina, Amicacina, Cefotaxima, Cefazolina, Cefalexina.	Não
23	Ampicilina, Amicacina trocada em 21/08 para Cefotaxima, Metronidazo(18/8-28/08/15), Vancomicina(11/9-22/9), Meropenenem (11/9-13/9)), Vanco e Mero(29/9-6/10), Linezolida (6/10-23/10)/Meropenem(14/10-23/10)/ Metronidazol(20/10-23/11)/Vanco e Mero(28/10-30/10)/Vanco e Mero(20/11-30/11), Vanco(19 a 20/12), Ampicilina (20/12-31/12), Vanco(6/1-11/1), Cefepime (06/01-08/01), Meropenem(8/01-19/01))Cefepime e Metronidazol(22/01-30/01)Vanco e Mero(30/01-01/02),Micafungian(01/02-19/02),Anfotericina B(02/02-19/02), Vanco(04/02-12/02),Vanco(16/02-27/02),Mero(16/02-23/02),Cefepime(23/02-27/02).	Não
24	Vanco e Mero(16/09 a 30/09)/Amica (23/09 a 28/09)/Vanco e Mero (02/10 a 08/10)/Amica e Metronidazol26/10ª26/10)/Vanco (26/10 a 27/10)/Mero(26/10ª06/11)/Vanco(06/11ª21/11)/Amica(6/11 a8/11)/Mero18/11ª23/11)/Vanco23/11/Fluconazol23/11/Micafungina(23/11 a 3/12)/Linezolida(23/11ª24/11)/Polimixina(23/11ª03/12)/Bactrim(24/11ª3/12)/Vanco(24/11ª3/12)/Cefazolina(5/02ª6/02/16)/Vanco(14/2ª16/2/2016)/Pipetazo(14/2ª 16/2/2016=	Sim
25	Ampicilina, Amicacina.	Não
26	Ampicilina, Amicacina, Cefotaxima.	Não
27	Ampicilina, Amicacina, Metronidazol.	Não
28	Ampicilina, Amicacina, Vancomicina, Menopenem, Cefepime.	Não
29	Ampicilina, Amicacina, Cefotaxima, Metronidazol, Vancomicina, Metronidazol, Meropenem, Colistina.	Sim
30	Amicacina, Ampicilina, Cefotaxima, Metronidazol.	Sim

Tabela 5. Complicações

Caso	Complicações	Culturas
1	Sepse	Negativas
2	HipoNa, HiperK e hipoK, sangramento digestivo	Não colhidas sem infecçao
3	Hemocultura 30/01 S. coagulase (-) oxa-R. Hemocul 01/03 cocos gram (+) S. epidermidis e sepse pelo mesmo. Sepse por 110erifér (epidermidis); bronquiolite.	
4	Sepse tardia resolvida; convusão neonatal; entero-entero anastomose; acidose metabólica. S. epidermidis	Hemocultura central 07/02 cocos gram (+) S. epidermidis.
5	Refluxo; 110erifér umbilical.	Não.
6	Infecção urinária (110erifér) em 16 e 30 /03/2015	UROC + Candida Albicans (16/03/15) e UROC + Candida Albicans (20/03/15)
7		
8	08/12 sepse. 28/01 ITU E. cloacae e Enterococcus sp.	
9	ITU Pseudomonas (15/01).	UROC Pseudomona 15/01/15
10	Sepse por epidermidis e haemolitycus.	15/03 HMC 110eriférica S. Epidermidis e HMC central S. Epidermidis e S. Haemoliticus
11	Infecção trato 110eriféri (E. coli)	UROC 13/03 E Coli e Keuyvera Ascorbata; 15/03 Sec Ocular S. Epidermidis
12	Baixo peso.	Negativas
13	Sepses (staphylo e klebisiela); infecção urinária (enterobacter); cateter (P. mirabilis e K. pneumoniae); anemia; hipoglicemia; Colon Hipoplasico e Estenose de Piloro.	S. Haemoliticus(PICC 20/03); uroc Enterobacter Cloacae, HMCp Klebsiella Pneumoniae,Ponta do CVC Proteus Mirabilis e K. Pneumoniae 10/05; Ponta do CVC em 17/06 S. Epidermidis; Ponta CVC em 11/07 B. Cepacia
14	Anemia; Sepse NN Tardia	HMCperiferica Stafilococo Epidermidis
15	Colestase: Infecção ocular Esq, Sepse; Sepse relacionada a Cateter	HMC central, HMCp e Cultura de ponta de cateter 31/05 Stafilococo Epidermidis
16	Sindrome de Beckwith Wiedeman	UROC Fneg; , HMC central e HMC 110eriférica Negativas
17	Dilataçao mod de camaras D, Canal Arterial 6mm	Negativas
18	Sepse Neonatal Tardia por Epidermidis.	HMC 07/05 Final Neg/HMCperiferica 19/05 S Epidermidis; Cultura de Ponta de PICC 21/05 S. Epidermidis; HMC 26/05 Final Negativa
19	Sepse Neonatal Tardia	HMCc 01/06 S. Epidermidis/UROC 01/06klebsiella Pneumoniae; HMC 08/06 Final Neg; HMC 18/06 Final Neg.HMC 25/06 Final Neg;
20	CIA 6,5 mm, Anemia; Enterectomia 5 cms	Negativas
21	Sepse Neonatal Precoce Presumida: Choque Septico; IRA	Negativas
22	Dilataçao Pielocalicial Bilateal; CIV	HMC 26/06 Negativa e UROC 09/07 e 20/07 Negativas
23	Intolerancia a deita e Ileo prolongado//Reabordada em 30/9/15	HMC e UROC (21/8/15) Final Neg/ HMCperiferica(11/9)Stafilococos Epidermidis UROC Fneg HMCCentral(12/09) S. Epidermidis// HMCperiferica(17/9) FinalNegativa//HMCperiferica(30/9)Estafilococos Epidermidis//UROC(30/09)FinalNegativa//HMCcentral(01/10)Estafilococos Epidermidis OxaR//CulturadeLCR(01/10(FinalNeg//HMCperiferica(03/10)Estafilococo Epidermidis//Cult ponta de cateter(07/10)FinalNeg//HMCperiferica(09/10)FinalNeg//HMCcentral(12/10)FinalNeg//HMCperiferica(12/10)FinalNeg//UROC(13/10)FinalNeg//HMCperiferica(14/10)FinalNeg//HMCcentral(15/10)FinalNeg//UROC(15/10)FinalNeg//CultdepontadoPICC(19/11)FinalNeg//HMCper(18/11)FinalNeg//HMCcentral(19/11)FinalNeg//HMCperif(12/12)finalNeg//HMCcentral(12/12)FinalNeg//HMCperif(17/12)FinalNeg//HMCcentral(17/12)FinalNeg//UROC(17/12)Enterococcus Faecalis//UROC(23/12)FinalNeg//HMCperif(06/01/16)Enterobacter Cloacae//HMCcentral(06/01)FinalNeg//UROC/06/01)FinalNeg//HMccentral(08/01)FinalNeg//HMCperif(12/01)FinalNeg//HMCcentral30/01)Candida Guillermondii//HMCperif(31/01)CandidaGuillermondii//UROC(31/01)FinalNeg//Cultura de ponta de cateter(01/02)FinalNeg//HMCperif(04/02)//HMCcentral(16/02)Estafilococo Epidermidis//HMCperif(16/02)Estafilococo Epidermidis//UROC(16/02)E.Colli//HMCperif(19/02)FinalNeg//UROC(19/02)FinalNeg//
24	Dehiscencia da anastomose(reop) em 23/09/Sepse por CVC S. Epidermidis (06/11). ITU K. oxitoca. Adeno 110erif e Rota (+). 18/11 perfuração do intestino/Ictecicia Colestatica/ Absceso de 110erifé bilateral//Imunodeficiëncia.	Cultura de pnta de CVC08/11/15 S.Epidermidis//HMCperiferica23/11/15FinalNeg//UROC23/11/15FinalNeg//Cultura de Liquido Pleural24/11 Final Neg//HMCperiferica29/11/15FinalNeg//Cultura de ponta do CVC29/11FinallNeg//HMC(05/12)FinalNeg//UROC(05/12)FinalNeg//HMCperiferica(13/02)FinalNeg//UROC(13/02/16)FinalNeg
25	Precisou colocar tela de Marlex no 110erifé no IO de 110eriféri de Onfalocele	Negativas
26	Insuficiencia renal reolvida	HMCperiferica 03/10 Final Negativa
27	Prematuridade tardia	Negativas
28	Pentalogia cantrell; Sepse Neonatal Tardia(09/11)	Negativas
29	Sangramento intestinal. 11/02/2016 Sepse presumida S. aureus. 20/01/2016 Urosepse E. cloacea.	UROC 20/01 Enterobacter Cloacae Complex;HMCp Stafilococo Oxa S em 11/02/15
30	Atresia jejunal; Sepse Neonatal Precoce sem Meningite	

Tabela 6: Cultura e Data

Caso	Paciente	Sepse	Culturas
1	LAG	Sim	Negativas
2	DLAS	Não	-
3	JCWM	Sim	-
4	LSC	Sim	Hemocultura central 07/02 cocos gram (+) S. epidermidis.
5	JVMN	Não	-
6	GPM	Não	UROC + Candida Albicans (16/03/15) e UROC + Candida Albicans (20/03/15)
7	GMRL	Não	-
8	DWBC	Sim	-
9	PPNSF	Sim	UROC Pseudomona 15/01/15
10	BQV	Sim	15/03 HMC 111eriférica S. Epidermidis e HMC central S. Epidermidis e S. Haemoliticus
11	HGQ	Não	UROC 13/03 E. Coli e Keuyvera Ascorbata; 15/03 Sec Ocular S. Epidermidis
12	GOR	Não	Negativas
13	FSS	Sim	S. Haemoliticus (PICC 20/03); uroc Enterobacter Cloacae, HMCp Klebsiella Pneumoniae,Ponta do CVC Proteus Mirabilis e K. Pneumoniae 10/05; Ponta do CVC em 17/06 S. Epidermidis; Ponta CVC em 11/07 B. Cepacia
14	ADNQ	Sim	HMC 111eriférica Stafilococo Epidermidis
15	EGAMSO	Sim	HMC central, HMCp e Cultura de ponta de cateter 31/05 Stafilococo Epidermidis
16	MIS	Não	UROC Fneg, HMC central e HMC 111eriférica Negativas
17	YSG	Não	Negativas
18	HS	Sim	HMC 07/05 Final Neg/ HMCperiferica 19/05 S. Epidermidis; Cultura de Ponta de PICC 21/05 S. Epidermidis; HMC 26/05 Final Negativa
19	OHAS	Sim	HMCc 01/06 S. Epidermidis/UROC 01/06klebsiella Pneumoniae; HMC 08/06 Final Neg; HMC 18/06 Final Neg.HMC 25/06 Final Neg;
20	MQM	Não	Negativas
21	RCL	Não	Negativas
22	CDB	Não	HMC 26/06 Negativa e UROC 09/07 e 20/07 Negativas
23	DNAR	Não	HMC e UROC (21/8/15) Final Neg // HMC 111eriférica (11/9) Stafilococos Epidermidis UROC Fneg HMC Central (12/09) S. Epidermidis HMC 111eriférica (17/9) Final Negativa // HMC 111eriférica (30/9) Estafilococos Epidermidis UROC (30/09) Final Negativa // HMC central (01/10) Estafilococos Epidermidis OxaR Cultura de LCR (01/10) FinalNeg // HMC 111eriférica (03/10) Estafilococo Epidermidis Cult ponta de cateter (07/10) Final Neg HMC 111eriférica (09/10) Final Neg // HMC central (12/10) Final Neg HMC periférica (12/10) Final Neg // UROC (13/10) Final Neg HMC periférica (14/10) Final Neg // HMC central (15/10) Final Neg UROC (15/10) Final Neg // Cult de ponta do PICC (19/11) Final Neg HMC per (18/11) Final Neg HMC central (19/11) Final Neg HMC perif (12/12) final Neg // HMC central (12/12) Final Neg HMC perif (17/12) Final Neg // HMC central (17/12) Final Neg UROC (17/12) Enterococcus Faecalis // UROC (23/12) Final Neg HMC perif (06/01/16) Enterobacter Cloacae // HMC central (06/01) Final Neg UROC (06/01) Final Neg // HMC central (08/01) Final Neg HMC perif (12/01) Final Neg // HMC central (30/01) Candida Guillermondii HMCperif (31/01) Candida Guillermondii // UROC (31/01) Final Neg Cultura de ponta de cateter (01/02) Final Neg // HMC perif (04/02) HMC central (16/02) Estafilococo Epidermidis HMC perif (16/02) Estafilococo Epidermidis UROC (16/02) E.Colli // HMC perif (19/02) Final Neg // UROC (19/02) Final Neg
24	GBC	Sim	Cultura de pnta de CVC (08/11/15) S. Epidermidis // HMC periférica (23/11/15) Final Neg UROC (23/11/15) Final Neg // Cultura de Liquido Pleural (24/11) Final Neg HMC periférica (29/11/15) Final Neg // Cultura de ponta do CVC (29/11) Final lNeg HMC (05/12) FinalNeg // UROC (05/12) Final Neg HMC periférica (13/02) Final Neg // UROC (13/02/16) Final Neg
25	CMM	Não	Negativas
26	CVSS	Não	HMCperiferica (03/10) Final Negativa
27	NIMO	Não	Negativas
28	MIOG	Não	Negativas
29	MKCS	Sim	UROC (20/01) Enterobacter Cloacae Complex; HMCp Stafilococo Oxa S (11/02/15)
30	GSPM	Sim	

Tabela 7: Dieta Enteral

Caso	Paciente	Tipo de dieta enteral
1	LAG	LMO ou FH (Hidrolisado) após Seio e alta com SM e FLT
2	DLAS	SM (seio)ou FLT via oral
3	JCWM	SM (seio)ou FH via oral transição para FLT para alta
4	LSC	LMO ou FH (Hidrolisado)após Seio e alta com SM e FLT
5	JVMN	FLT 24/02 não tolerou susp em 25/02//27/02 FH aceitou//SM e FH 01/03// 03/03 VO e FLT
6	GPM	Não teve dieta enteral
7	GMRL	26/02 FH// 01/03 SM// 03/03 FLT alta com SM e FLT
8	DWBC	01/01/15 FH ou LMO// 09/01 FLT ou SM
9	PPNSF	FH 01/01/15//SM/ FLT
10	BQV	11/03 SM ou FH// 14/03 SM ou FLT
11	HGQ	18/03 SM e FH; 22/03 SM e FLT
12	GOR	13/03 FLT; 14/03 LMO ou FH; 16/03 Sm ou FLT
13	FSS	01/06 FH/LMO susp em 01/06; FH iniciada e susp em 24/06; FH reiniciada em 27/06 tolerou; SM em 28/06 e trocada FH para FLT em 29/06; Leite desnatada iniciada em 03/07 acrescentado Maltodextrina 3% e TCM3% em 04/07; trocada a FH em 13/07 e FLTe SMLD em 17/07.
14	ADNQ	LMO/FH e depois SM e FLT
15	EGAMSO	FH/LMO 23/05;SM 26/05; FLT 02/06
16	MIS	LMO ou FLT 18/04
17	YSG	Não recebeu
18	HS	FLT e Seio Materno
19	OHAS	FLTem 13/06/ SM 18/06
20	MQM	LMO/FH 24/06; SM28/06 e FLT 29/06/15
21	RCL	LMO/FH 21/06; FLT 29/06 e SM 02/07/15.
22	CDB	LMO/FH 20/07; FL sem lactose 22/07; LMO /SM 26/07.
23	DNAR	Dieta oral a partir do 1º ano
24	GBC	Tentado no início Seio e FH// LMO e FLT sem sucesso// Fórmula Hidrolisada sem sucesso
25	CMM	SM/LMO/FLT 28/09
26	CVSS	Não recebeu
27	NIMO	Aleitamento materno
28	MIOG	LMO/FH; SM em 02/11; FLT 07/11
29	MKCS	FH 14/01/16; Seio Materno/Nan AR 28/01/16
30	GSPM	SM/ FLT em 02/12/2015

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1, -NOME: ....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: .M □ F □
DATA.NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: ..... BAIRRO: .....
CIDADE ..... CEP: .....
TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL.LEGAL
.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: .....SEXO: M □ F □
DATA.NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº .....
APTO: ..... BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: .....
TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

"CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL EM RECÈM NASCIDOS COM DEFEITOS CONGÊNITOS DO TRATO GASTROINTESTINALSUBMETIDOS À CORREÇÃO CIRÚRGICA"

2. PESQUISADOR: Dra Nadia Sandra Orozco vargas

CARGO/FUNÇÃO: Médico Neonatologista.....
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 107353.....
UNIDADE.DO.HCFMUSP:
Centro.de.Tratamento. Intensivo.Neonatal.**2**
.....
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO X□ RISCO MÉDIO □
RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 1 ano e 6 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____
Rubrica do pesquisador_____

Figura 10. Gastrosquise

Figura 11. Onfalocele

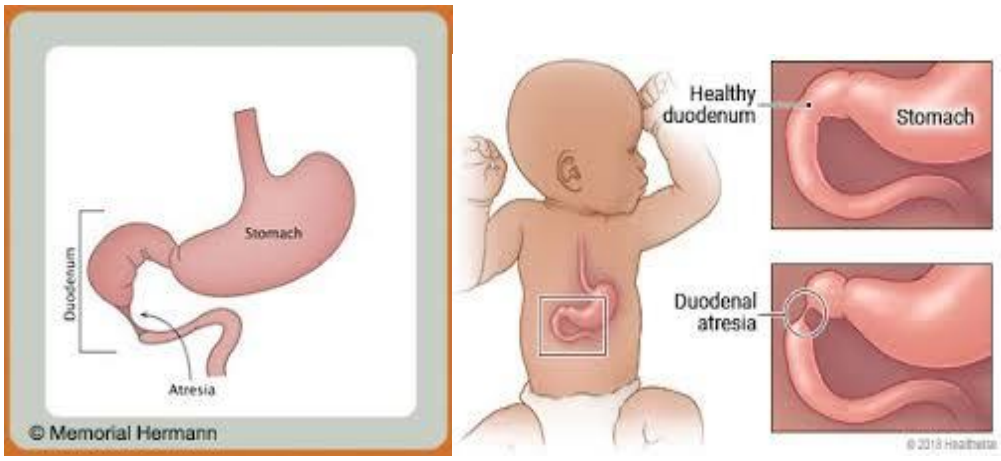

Figura 12. Atresia intestinal

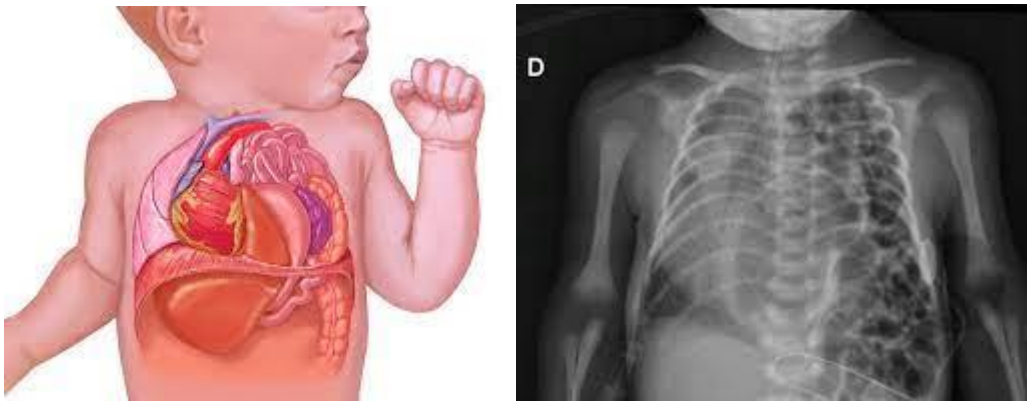

Figura 13. Hernia diafragmática congênita

10. REFERÊNCIAS

Acharya C, Bajaj JS. Chronic Liver Diseases and the Microbiome-Translating Our Knowledge of Gut Microbiota to Management of Chronic Liver Disease. *Gastroenterology.* 2021;160(2):556-72.

Agostini C, Mazzocchi A. Commentary on Enhanced nutrient supply and intestinal microbiota development in very low birth weight infants. *Pediatr Res*. 2019;86(3):291-2.

Alexandrova L, Haque F, Rodriguez P, Marrazzo AC, Grembi JA, Ramachandran V, Hryckowian AJ, Adams CM, Siddique MSA, Khan AI, Qadri F, Andrews JR, Rahman M, Spormann AM, Schoolnik GK, Chien A, Nelson EJ. Identification of Widespread Antibiotic Exposure in Patients With Cholera Correlates With Clinically Relevant Microbiota Changes. *J Infect Dis*. 2019;220(10):1655-66.

Angelo, B. J. **Resistência a antibióticos e o impacto no microbioma intestinal humano**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.Disponível em: https://repositorio.usp.br/directbitstream/8104160c-d351-414b-9761-8e6593d7dd76/3050051.pdf. Acesso em: 18 ago. 2022.

Antosca KM, Chernikova DA, Price CE, Ruoff KL, Li K, Guill MF, Sontag NR, Morrison HG, Hao S, Drumm ML, MacKenzie TA, Dorman DB, Feenan LM, Williams MA, Dessaint J, Yuan IH, Aldrich BJ, Moulton LA, Ting L, Martinez-Del Campo A, Stewart EJ, Karagas MR, O'Toole GA, Madan JC. Altered Stool Microbiota of Infants with Cystic Fibrosis Shows a Reduction in Genera Associated with Immune Programming from Birth. *J Bacteriol*. 2019;201(16):e00274-19.

Aroniadis OC, Brandt LJ. Fecal microbiota transplantation: past, present and future. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29(1):79-84.

Azad MB, Bridgman SL, Becker AB, Kozyrskyj AL. Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(10):1290-8.

Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, Mihatsch W, Moreno L, Pieścik M, Puntis J, Shamir R, Szajewska H, Turck D, van Goudoever J; ESPGHAN Committee on Nutrition. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(2):238-50.

Brandt K, Taddei CR, Takagi EH, Oliveira FF, Duarte RT, Irino I, Martinez MB, Carneiro-Sampaio M. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67(2):113-23.

Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, Korecka A, Bakocevic N, Ng LG, Kundu P, Gulyás B, Halldin C, Hultenby K, Nilsson H, Hebert H, Volpe BT, Diamond B, Pettersson S. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med.* 2014;6(263):263ra158.

Bresesti I, Salvatore S, Valetti G, Baj A, Giaroni C, Agosti M. TheMicrobiota-Gut Axis in Premature Infants: Physio-Pathological Implications. *Cells.* 2022;11(3):379.

Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol*. 2013;14(7):676-84.

Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(3):544-31.

Calil VMLT, Falcão MC. Composição do leite humano: o alimento ideal. *Rev Med (São Paulo).* 2003;82(1-4):1-10.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lopuzone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335-6.

Carvalho-Ramos II, Duarte RTD, Brandt KG, Martinez MB, Taddei CR. Breastfeeding increases microbial community resilience. *J Pediatr (Rio J).* 2018;94(3):258-267.

Chong CYL, Bloomfield FH, O'Sullivan JM. Factors Affecting Gastrointestinal Microbiome Development in Neonates. *Nutrients.* 2018;10(3):274.

Clavijo V, Florez MJV. The gastrointestinal Microbiome and its association with the control of pathogens in broliler chicken production. A review. *Poult Sci*. 2018;97(3):1006-21.

Codex Alimentarius Comission – FAO E OMS. 2020. Available from: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/

Coker MO, Hoen AG, Dade E, Lundgren S, Li Z, Wong AD, Zens MS, Palys TJ, Morrison HG, Sogin ML, Baker ER, Karagas MR, Madan JC. Specific class of

intrapartum antibiotics relates to maturation of the infant gut microbiota: a prospective cohort study. *BJOG*. 2020;127(2):217-27.

Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol*. 2019;27(12):997-1010.

Dicken BJ1, Sergi C, Rescorla FJ, Breckler F, Sigalet D. Medical management of motility disorders in patients with intestinal failure: a focus on necrotizing enterocolitis, gastroschisis, and intestinal atresia. *J Pediatr Surg*. 2011;46(8):1618-30.

Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology.* 2011;140(6):1713-9.

Eberl G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunol.* 2010;3(5):450-60.

Epifanio M. Componentes das fórmulas infantis: O que temos no horizonte? *International Journal of Nutrology.* 2017;10(1):313S-315.

Fanaro S. Feeding intolerance in the preterm infant. *Early Hum Dev*. 2013;89(2):S13-20.

Filyk HA, Osborne LC. The Multibiome: The Intestinal Ecosystem's Influence on Immune Homeostasis, Health, and Disease. *EBioMedicine*. 2016;13:46-54.

Fiocchi C, Souza HSP. Microbiota intestinal: sua importância e função / Intestinal microbiota: its importance and function. *J Bras Med*. 2012;100(3):30-8.

Forsythe P, Bienenstock J. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol Invest*. 2010;39(4-5):429-48.

Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol*. 2013;11(8):e1001631.

Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R. Compreensão atual do microbioma humano. Nat Med. 2018;24(4):392-400. doi:10.1038/nm.4517 - DOI - PMC - PubMed

Goldszmid RS, Trinchieri G. The price of immunity. *Nat Immunol.* 2012;13(10):932-8.

Gorkiewic ZG., Moschen A. Gut Microbiome a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Arch*. 2018;472(1):159-72.

Greer JJ. Current concepts on the pathogenesis and etiology of congenital diaphragmatic hernia. Respir Physiol Neurobiol. 2013;189(2):232-40.

Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30(1):61-7.

Kapourchali FR, Cresci GAM. Early-Life Gut Microbiome-The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment. *Nutr Clin Pract.* 2020;35(3):386-405.

Kennedy KM, Gerlach MJ, Adam T, Heimesaat MM, Rossi L, Surette MG, Sloboda DM, Braun T. Fetal meconium does not have a detectable microbiota before birth. *Nat Microbiol*. 2021;6(7):865-73.

Koch L. Early-life antibiotic use and gut microbiota. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):630.

Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(17):5112-20.

Lee YS, Kim TY, Kim Y, Lee SH, Kim S, Kang SW, Yang JY, Baek IJ, Sung YH, Park YY, Hwang SW, O E, Kim KS, Liu S, Kamada N, Gao N, Kweon MN. Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell Host Microbe*. 2018;24(6):833-46.

Li F, Wu SS, Lynn CB, Harris Ch, Richards J, Wampler JL, Zhuang W, Cleghorn G, Rudolph CD, Liu B, Shaddy J, Colombo J. Improved Neurodevelopmental Outcomes Associated with Bovine mil Fat Globule Membrane and Lactoferrin in Infant Formula: A randomized, Controlled Trial *J Pediatr.* 2019; 215:24-31.

Liu J, Wang M, Chen W, Ma J, Peng Y, Zhang M, Wang C, Yan G and Lu G (2021) Altered Gut Microbiota Taxonomic Compositions of Patients With Sepsis in a Pediatric Intensive Care Unit. Front. Pediatr. 9:645060. doi: 10.3389/fped.2021.64506

Lynch SV, Pedersen O. O microbioma intestinal humano na saúde e na doença. N Engl J Med. 2016;375(24):2369-2379. doi:10.1056/NEJMra1600266 - DOI - PubMed

Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients*. 2020;12(4):1039.

Madan JC, Salari RC, Saxena D, Davidson L, O'Toole GA, Moore JH, Sogin ML, Foster JA, Edwards WH, Palumbo P, Hibberd PL. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2012;97(6):F456-62.

Mai V, Young CM, Ukhanova M, Wang X, Sun Y, Casella G, Theriaque D, Li N, Manzoni P, De Luca D, Stronati M, Jacqz-Aigrain E, Ruffinazzi G, Luparia M, Tavella E, Boano E, Castagnola E, Mostert M, Farina D. Prevention of nosocomial infections in neonatal intensive care units. *Am J Perinatol*. 2013;30(2):81-8.

Manzoni P, De Luca D, Stronati M, Jacqz-Aigrain E, Ruffinazzi G, Luparia M, Tavella E, Boano E, Castagnola E, Mostert M, Farina D. Prevention of nosocomial infections in neonatal intensive care units. *Am J Perinatol.* 2013;30(2):81-8.

Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* 2012;489(7415):231-41.

McKeen S, Young W, Mullaney J, Fraser K, McNabb WC, Roy NC. Infant Complementary Feeding of Prebiotics for the Microbiome and Immunity. *Nutrients.* 2019;11(2):364.

McLean C, Jun S, Kozyrskyj A. Impact of maternal smoking on the infant gut microbiota and its association with child overweight: a scoping review. *World J Pediatr*. 2019;15(4):341-9.

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turroni F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arboleya Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017;81(4):e00036-17.

Mor G, Kwon JY. Trophoblast-microbiome interaction: a new paradigm on immune regulation. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(4 Suppl): S131-7.

Moreira L, Thomas A, Matuhara A, Ceccon MER, Setubal J, Tannuri U, Feferbaum R, Taddei C. Pathogenic bacteria as dominant members in intestinal microbiota of critical neonates in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr(Rio J).* [in submettid]. JPED_2019_135

Moron AF. Author's reply re: Infant microbiota and antibiotic prophylaxis in caesarean delivery. *BJOG*. 2020;127(4):520-1.

Moron AF. Infant microbiota and antibiotic prophylaxis in caesarean delivery. *BJOG*. 2020;127(2):207.

Muller EM, Fine M, Ritchie KB. The stable microbiome of inter and sub-tidal anemone species under increasing pCO₂. *Sci Rep*. 2016;6:37387.

Neville MC, Anderson SM, McManaman JL. Lactation and Neonatal Nutrition defining and refering the clinical questions. *J Mamamry Gland Biol Neoplasia.* 2012;17(2):167-88.

Niemarkt HJ, De Meij TG, van Ganzewinkel CJ, de Boer NKH, Andriessen P, Hütten MC, Kramer BW. Necrotizing Enterocolitis, Gut Microbiota, and Brain Development: Role of the Brain-Gut Axis. *Neonatology.* 2019;115(4):423-31.

Nogacka AM, Salazar N, Arboleya S, Suárez M, Fernández N, Solís G, de Los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Early microbiota, antibiotics and health. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(1):83-91.

Nyangahu DD, Jaspan HB. Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant I mmunity. *Clin Exp Immunol*. 2019;198(1):47-56.

Osadchiy V, Martin CR, Mayer EA. The Gut-Brain Axis and the Microbiome: Mechanisms and Clinical Implications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):322-32.

Pan K, Zhang C, Tian Os efeitos de diferentes modos de parto na estrutura e função prevista da microbiota intestinal em recém-nascidos e bebês prematuros. J.Pol J Microbiol. 2021 março;70(1):45-55. doi: 10.33073/pjm-2021-002. Epub 2021 9 de março.PMID: 33815526

Paparo L, Nocerino R, Cosenza L, Aitoro R, D'Argenio V, Del Monaco V, Di

Scala C, Amoroso A, Di Costanzo M, Salvatore F, Berni Canani R. Epigenetic features of FoxP3 in children with cow's milk allergy. *Clin Epigenetics.* 2016;8:86.

Pasolli E, Asnicar F, Manara S, Zolfo M, Karcher N, Armanini F, Beghini F, Manghi P, Tett A, Ghensi P, Collado MC, Rice BL, DuLong C, Morgan XC, Golden CD, Quince C, Huttenhower C, Segata N. Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell.* 2019;176(3):649-62.

Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy.* 2007;62(11):1223-36.

Philips CA, Pande A, Shasthry SM, Jamwal KD, Khillan V, Chandel SS, Kumar G, Sharma MK, Maiwall R, Jindal A, Choudhary A, Hussain MS, Sharma S, Sarin SK. Healthy Donor Fecal Microbiota Transplantation in Steroid-Ineligible Severe Alcoholic Hepatitis: A Pilot Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(4):600-2.

Prefumo F, Izzi C. Fetal abdominal wall defects. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2014;28(3):391-402.

Preidis GA, Versalovic J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology.* 2009;136(6):2015-31.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glockner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):590-6.

Radjabzadeh D, Boer CG, Beth SA, van der Wal P, Kiefte-De Jong JC, Jansen MAE, Konstantinov SR, Peppelenbosch MP, Hays JP, Jaddoe VWV, Ikram MA,

Rivadeneira F, van Meurs JBJ, Uitterlinden AG, Medina-Gomez C, Moll HA, Kraaij R. Diversity, compositional and functional differences between gut microbiota of children and adults. *Sci Rep.* 2020;10(1):1040.

Rao S, Simmer K, Patole S. Probiotic supplementation in neonates with major gastrointestinal surgical conditions: a systematic review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018;31(11):1517-23.

Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(10):565-76.

Redondo AC, Feferbaum R, Vieira RA, Moreira DAR, Tannuri U, Carvalho WB, Ceccon MEJR. Characteristics of the clinical development of a newborn with gastroschisis in an intensive care unit in latin america. *J Hum Growth Dev.* 2016;*26*(2):190-8.

Richardson L, Paulis WD, van Middelkoop M, Koes BW. An overview of national clinical guidelines for the management of childhood obesity in primary care.*Prev Med*. 2013;57(5):448-55.

Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbad A, Jenmalm MC, Marchesi JR, Collado MC. The composition of th gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26050.

Rozé JC, Ancel PY, Marchand-Martin L, Rousseau C, Montassier E, Monot C, Le Roux K, Butin M, Resche-Rigon M, Aires J, Neu J, Lepage P, Butel MJ; EPIFLORE Study Group. JAMA Netw Open. 2020 Sep 1;3(9):e2018119.

doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.18119. PMID: 32965499 Free PMC.

Seki D, Mayer M, Hausmann B, Pjevac P, Giordano V, Goeral K, Unterasinger L, Klebermaß-Schrehof K, De Paepe K, Van de Wiele T, Spittler A, Kasprian G, Warth B, Berger A, Berry D, Wisgrill L. Aberrant gut-microbiota-immune-brain axis development in premature neonates with brain damage. *Cell Host Microbe*. 2021;29(10):1558-72.

Sevelsted A, Stokholm J, Bønnelykke K, Bisgaard H. Cesarean section and chronic immune disorders. *Pediatrics.* 2015;135(1): e92-8.

Shanahan F, Ghosh TS, O'Toole PW. The Healthy Microbiome-What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome? *Gastroenterology*. 2021;160(2):483-94.

Sharma AA, Jen R, Butler A, Lavoie PM. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin Immunol*. 2012;145(1):61-8.

Sharpton S, AjmeraV, Loomba R. **Papel emergente do microbioma intestinal na doença hepática gordurosa não alcoólica: da composição à função.** Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2019. Volume 17, Edição 2 , Janeiro de 2019, Páginas 296-306

Silvestre CMRF. O diálogo entre o cérebro e o intestino: Qual o papel dos probióticos? Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa; 2015. 53p.

Smilowitz, Jennifer T. et al. Safety and tolerability of Bifidobacterium longum subspecies infantis EVC001 supplementation in healthy term breastfed infants:

a phase I clinical trial. Bmc Pediatrics, [s.l.], v. 17, n. 1, p.133, 30 maio 2017. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1186/s12887-017-0886-9.

Taddei CR, Cortez RV, Mattar R, Torloni MR, Daher S. Microbiome in normal and pathological pregnancies: A literature overview. *Am J Reprod Immunol*. 2018;80(2):e12993.

Taddei CR, Oliveira FF, Duarte RT, Talarico ST, Takagi EH, Ramos Carvalho II, Gomes FM, Brandt K, Martinez MB High abundance of Escherichia during the establishment of fecal microbiota in Brazilian children. *Microb Ecol.* 2014;67(3):624-34.

Taddei CR, Feferbaum R. *Microbiota intestinal no início da vida*. São Paulo: ILSI Brasil - International Life Sciences Institute do Brasil, 2016. -- (Série de publicações Ilsi Brasil: Força Tarefa de Nutrição da Criança; v. 3)
32p.

Talarico ST, Santos FE, Brandt KG, Martinez MB, Taddei CR. Anaerobic bactéria in the intestinal microbiota of Brazilian children. *Clinics (Sao Paulo).* 2017;72(3):154-60.

Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med*. 2016;22(7):713-22.

Tanaka S, Kobayashi T, Songjinda P, Tateyama A, Tsubouchi M, Kiyohara C, Shirakawa T, Sonomoto K, Nakayama J. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;56(1):80-7.

Tannuri ACA, Silva LM, Leal AJG, Ricardi LRS, Tannuri U. Qual é a melhor solução de hidratação parenteral a ser utilizada no tratamento pós-operatório de recém-nascidos com gastrosquise? Experiência do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. *Pediatria(São Paulo)* 2010;32(2):84-9.

Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017;474(11):1823-36.

Tiffon C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human

Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3425.

Torrazza RM, Neu J. The altered gut microbiome and necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol.* 2013;40(1):93-108.

Van den Akker CHP, van Goudoever JB, Shamir R, Domellöf M, Embleton ND, Hojsak I, Lapillonne A, Mihatsch WA, Berni Canani R, Bronsky J, Campoy C, Fewtrell MS, Fidler Mis N, Guarino A, Hulst JM, Indrio F, Kolaček S, Orel R, Vandenplas Y, Weizman Z, Szajewska H. Probiotics and Preterm Infants: A Position Paper by the European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition and the European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Working Group for Probiotics and Prebiotics. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2020;70(5):664-80.

Verma A, Nain Rattan K, Yadav R. Obstrução Intestinal Neonatal: Uma Experiência de 15 anos em Hospital Terciário.

J Clin Diag Res. 2016 fevereiro; 10(2): SC10–SC13. Publicado online em 1º de fevereiro de 2016. doi: 10.7860/JCDR/2016/17204.7268

Victora CG, Horta BL, Loret de Mola C, Quevedo L, Pinheiro RT, Gigante DP, Gonçalves H, Barros FC. Association between breastfeeding and intelligence, educational attainment, and income at 30 years of age: a prospective birth cohort study from Brazil. *Lancet Glob Health*. 2015;3(4):e199-205.

Vuong HE, Hsiao EY. Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry*. 2017;81(5):411-23.

Vyas U, Ranganathan N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:872716.

Wang S, Ryan CA, Boyaval P, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Maternal Vertical Transmission Affecting Early-life Microbiota Development. *Trends Microbiol.* 2020;28(1):28-45.

Wydau-Dematteis S, Delannoy J, Téolis AC, Giuseppi A, Campeotto F, Lapillonne A, Butel MJ, Aires J.Microrganismos. 18 de março de 2022;10(3):654. doi: 10.3390/microorganisms10030654.PMID: 35336229

Winther ACR, Axelsson PB, Clausen TD, Løkkegaard ECL. Re: Infant microbiota and antibiotic prophylaxis in caesarean delivery. *BJOG*. 2020;127(4):520.

Wong, Wing Fei; Santiago, Marina. Microbial approaches for targeting antibioticresistant bacteria. Microbial Biotechnology, Somerville, v. 1, n. 10, p.1047-1053, jan. 2017.

World Gastroenterology Organisation. *Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia:* Probióticos e prebióticos. World Gastroenterology Organisation; 2017. 35p.

Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012;486(7402):222-7.

Zhang J, Zhao X, Jiang Y, Zhao W, Guo T, Cao Y, Teng J, Hao X, Zhao J, Yang Z. Antioxidant status and gut microbiota change in an aging mouse model as influenced by exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum YW11 iisolated from Tibetan kefir. *J Dairy Sci*. 2017;100(8):6025-41.

Zhuang L, Chen H, Zhang S, Zhuang J, Li Q, Feng Z. Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2019;17(1):13-25.