

MICROBIOMA INTESTINAL NO INÍCIO DA VIDA



ILSI

International Life
Sciences Institute
Brasil

SÉRIE DE PUBLICAÇÕES ILSI BRASIL:
Força-Tarefa Nutrição da Criança

VOLUME 3



ILSI

International Life
Sciences Institute
Brasil

**ILSI BRASIL
INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE DO BRASIL**

Rua Hungria, 664 — conj.113

01455-904 — São Paulo — SP — Brasil

Tel./Fax: 55 (11) 3035-5585 e-mail: ilsibr@ilsil.org.br

© 2017 ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)**

Taddei, Carla R.

Microbiota intestinal no início da vida / Carla R. Taddei, Rubens Feferbaum. -- São Paulo : ILSI Brasil - International Life Sciences Institute do Brasil, 2017. -- (Série de publicações Ilsi Brasil : força tarefa de nutrição da criança ; v. 3)

Bibliografia
ISBN: 978-85-

1. Bactérias 2. Bacteriologia 3. Células epiteliais 4. Intestinos - Microbiologia - Obras de divulgação
5. Sistema gastrointestinal - Microbiologia - Obras de divulgação I. Feferbaum, Rubens. II. Título III. Série.

17-01652

CDD-616.01
NLM-QW 000

Índices para catálogo sistemático:

1. Bacteriologia 616.01

Esta publicação foi possível graças ao apoio da Força-Tarefa Nutrição da Criança, subordinada ao Comitê de Nutrição e este ao Conselho Científico e de Administração do ILSI Brasil.

Segundo o estatuto do ILSI Brasil, no mínimo 50% de seu Conselho Científico e de Administração deve ser composto por representantes de universidades, institutos e órgãos públicos, sendo os demais membros representantes de empresas associadas.

Na página 29, encontra-se a lista dos membros do Conselho Científico e de Administração do ILSI Brasil e na página 31, as empresas mantenedoras da Força-Tarefa de Nutrição da Criança em 2017.

Para mais informações, entre em contato com o ILSI Brasil pelo telefone (11) 3035-5585 ou pelo e-mail: ilsibr@ilsibr.org.br

As afirmações e opiniões expressas nesta publicação são de responsabilidade dos autores, não refletindo, necessariamente, as do ILSI Brasil. Além disso, a eventual menção de determinadas sociedades comerciais, marcas ou nomes comerciais de produtos não implica endosso pelo ILSI Brasil.

Autores:

Carla R. Taddei

Professora Doutora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo. Microbiologista com expertise em Microbiota Humana e Relação Parasito-Hospedeiro. Membro da Diretoria Científica da Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM).

Rubens Feferbaum

Especialista em Neonatologia e Nutrologia pela SBP e BRASPEN. Professor Livre Docente em Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Médico da UTI neonatal do Instituto da Criança do HC Faculdade de Medicina da USP. Presidente dos Departamentos Científico de Suporte Nutricional da SBP e Nutrologia da SPSP. Coordenador científico da força tarefa de nutrição infantil ILSI-Brasil

ÍNDICE

Introdução	9
I. Fisiologia intestinal e sua interação com a microbiota	11
II. Identificação do Microbioma Intestinal: Metodologia de análise	14
III. Colonização do Recém-nascido	15
IV. O leite materno	18
V. Papel da lactose e oligossacarídeos do leite materno	18
VI. Eubiose e Disbiose no início da vida	20
VII. Probióticos e suas aplicações clínicas no período neonatal e a lactentes.	22
VIII. Considerações finais	24
IX. Referências bibliográficas	25
X. Conselho científico e de administração do ILSI Brasil	29
XII. Empresas mantenedoras da Força-Tarefa Nutrição da Criança	31

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) humano é um complexo ecossistema que envolve a interação entre bactérias, bactérias-hospedeiro, bactérias-nutrientes, além de nutrientes-hospedeiro¹.

Estima-se que o número de bactérias que habitam o intestino seja 10x superior ao número de células do organismo humano.

Assim, o microbioma, isto é, a coleção de material genético encontrado nesse ecossistema, contém 100x mais genes que o genoma humano².

FISIOLOGIA INTESTINAL E SUA INTERAÇÃO COM A MICROBIOTA

A arquitetura do epitélio intestinal envolve uma camada de muco, células epiteliais e lâmina própria, exercendo um efeito barreira³. As células epiteliais são revestidas por um gel de muco composto predominantemente de glicoproteínas, como as mucinas secretadas por células caliciformes.

Essas mucinas montam uma camada protetora de muco que se estende até 150 mM a partir da superfície do epitélio, sendo que a camada interna é resistente à penetração de bactérias. Isso define uma zona estéril que protege a superfície do epitélio intestinal contra a invasão de microrganismos⁴.

A camada de muco evita o excesso de translocação de metabólitos bacterianos e moléculas, como lipopolissacarídeo (LPS), para a circulação do hospedeiro, auxiliando na segregação de membros do microbioma das células do epitélio intestinal, além de permitir o reconhecimento da presença de bactérias por células imunes da lâmina própria³.

As bactérias são distribuídas por toda a camada de muco exterior, tendo na camada de muco uma fonte direta de carboidratos, peptídeos e nutrientes exógenos, incluindo vitaminas e minerais. Alguns microrganismos, particularmente os patogênicos, estão equipados com fatores de virulência que facilitam a sua penetração nas camadas de muco, permitindo a sua ligação específica à superfície das células epiteliais⁴.

O estabelecimento da ontogenia intestinal é um processo influenciado por fatores internos, intrínsecos ao hospedeiro, e fatores externos. Os chamados fatores externos incluem a composição do microbioma materno, a forma de nascimento (cesárea ou parto normal), contaminação ambiental, alimentação e uso de medicamentos⁵.

Os fatores internos são relacionados à fisiologia, como a anatomia do TGI, peristaltismo, ácidos biliares, potencial hidrogeniônico (pH) intestinal e resposta imunológica. Desta forma, a competição entre microrganismos por receptores da mucosa e as interações entre microrganismo e hospedeiro modulam sua composição e função, tornando o microbioma intestinal único e interpessoal².

As principais funções atribuídas ao microbioma intestinal incluem:

1. Modulação imunológica, permitindo que o sistema imunológico fique pronto para reagir contra bactérias patogênicas, além de ser capaz de se manter tolerante em relação aos membros do microbioma. A *função imunológica* do microbioma intestinal consiste do desenvolvimento do GALT (Tecido Linfóide Associado ao Intestino) em lactentes, que tem funções imunomoduladoras importantes⁶.

O reconhecimento das bactérias comensais das patogênicas, inibindo a sua proliferação e translocação do intestino para o organismo, é de primordial importância.

A interação da microbiota com células epiteliais, macrófagos e linfócitos da mucosa intestinal gera reação inflamatória e imunológica equilibrada com a produção das interleucinas (IL-6) e IgA.

A conjugação de microbiota, GALT e epitélio intestinal induz a diferenciação das células T de memória que regulam os mecanismos de tolerabilidade do sistema imune aos antígenos orais⁴.

O sistema imunológico imaturo do RN tende ao fenótipo das reações helper 2 (Th2), que aumentam a prevalência das reações alérgicas e doenças atópicas. A microbiota equilibra esta reação para o fenótipo T-helper 1 (Th1) com produção de IgA e células B, promovendo a tolerância aos antígenos orais.⁶⁻⁸

2. Resistência à colonização ou efeito barreira, impedindo a colonização do epitélio, além da produção de substratos que inibiriam o crescimento das bactérias patogênicas (antagonismo), e competição por nutrientes e sítios de adesão²,

3. Nutrição e metabolismo do hospedeiro, como o aumento da capacidade de digestão de polissacarídeos da dieta, alterações de motilidade e pH intestinal, favorecendo a absorção de íons e água².

As funções digestiva e metabólica da microbiota consistem na facilitação da absorção de minerais como o Cálcio, Fósforo e Ferro, bem como na regulação da absorção de água e eletrólitos nos cólons.

Atualmente, há grande interesse na composição da microbiota pela sua capacidade maior ou menor de extração de energia da dieta, que pode relacionar-se ao fator de risco para obesidade e síndrome metabólica⁹.

O microbioma degrada carboidratos não digeridos pela alimentação (prebióticos), produzindo substratos absorvidos pela célula intestinal do hospedeiro.

Alguns microrganismos do microbioma intestinal são capazes de produzir grandes variedades de ácidos graxos bioativos e metabólitos, tais como o ácido linoleico conjugado (CLA), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e gama-amino ácido butírico, que têm mostrado grande potencial no tratamento de doenças como câncer, obesidade e doenças cardiovasculares.

Um papel fundamental dos ácidos graxos de cadeia curta, principalmente o butirato, na fisiologia do cólon, é o seu efeito trófico sobre o epitélio intestinal, além de estimular a proliferação e a diferenciação das células epiteliais¹⁰.

No adulto, os principais Filos bacterianos presentes no microbioma intestinal são Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Verrucimicrobia e Actinobacteria.

O Filo Firmicutes foi proposto inicialmente para diferenciar bactérias Gram positivas, formadoras de esporos e com baixa proporção de quantidade de Citosina+Guanina (C+G) na composição molecular do DNA.

Porém, sabe-se que neste Filo estão inclusas também as bactérias Gram negativas, várias não formadoras de esporos e algumas com alta proporção de C+G, caracterizando-o como o Filo de maior diversidade bacteriana com mais de 230 gêneros bacterianos descritos até o momento.

É o Filo com maior representação no microbioma intestinal, e o mais diverso, incluindo gêneros bacterianos importantes na modulação do microbioma, como *Roseburia* e *Eubacterium*, importantes produtores de AGCC, além de incluir gêneros potencialmente patogênicos, como *Clostridium* e *Listeria*.

Bactérias que transformam lactato em butirato ou propionato, prevenindo o excesso de acidez pelo acúmulo de lactato, pertencem a este Filo, mostrando sua importância na regulação da homeostase do microbioma intestinal¹¹.

O Filo Bacteroidetes compreende os bacilos Gram negativos, anaeróbios, alguns aerotolerantes, que habitam o ambiente e o trato digestivo de animais e humanos.

Os gêneros que compõem a Família Bacteroidales são encontrados no microbioma intestinal humano com maior representatividade, destacando-se *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes* e *Parabacteroides*. *Bacteroides* estão relacionados com a degradação de polissacarídeos da dieta em carboidratos metabólitos, os quais serão absorvidos pelas células epiteliais. *Prevotella* são produtores de propionato, um importante AGCC¹².

A presença de butirato no cólon intestinal leva à modulação da população microbiana colônica, induzindo a multiplicação de espécies produtoras de butirato e permitindo um equilíbrio entre a presença de *Eubacterium* e *Bifidobacterium*.

Bactérias produtoras de butirato, como *Roseburia*, *F. prausnitzii* e *Eubacterium*, são capazes de fermentar produtos do metabolismo de oligossacarídeos produzidos por bifidobactérias.

Produtos intermediários de processos fermentativos de bifidobactérias do microbioma, como lactato, por exemplo, são encontrados em baixas concentrações em indivíduos saudáveis, pois são metabolizados por *Eubacterium* spp.

Esses eventos metabólicos ocorrem no intestino desde o nascimento, o que contribui para a modulação da eubiose, isto é, estado de equilíbrio do microbioma com o ambiente^{5,10,12}.

IDENTIFICAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL: METODOLOGIA DE ANÁLISE

Até o final dos anos 90, o microbioma intestinal humano era tradicionalmente avaliado pela análise de isolados a partir de métodos de culturas de anaeróbios estritos e facultativos. Contudo, bactérias cultiváveis representam 20-30% do total de bactérias encontradas na mucosa intestinal. Entre os fatores limitantes desses métodos, podem-se citar a baixa sensibilidade, baixa reprodutibilidade, além do longo tempo consumido para as análises e recuperação de apenas espécies cultiváveis. Com o resultado pode ocorrer a superestimação ou subestimação da quantidade de algumas espécies presentes no meio¹⁴⁻¹⁶.

As técnicas moleculares têm contribuído para a aplicação de métodos rápidos e independentes de cultivo, e revelado uma grande diversidade do microbioma nas amostras analisadas. Análises filogenéticas baseadas em PCR têm sido utilizadas para caracterizar o microbioma de fezes humana.

A biblioteca de *16S rRNA* (RNA ribossomal) vem demonstrando ser uma ótima técnica molecular para evidenciar a composição do microbioma intestinal¹⁷. Ribossomos procaríotos contêm duas subunidades, 50S e 30S. A subunidade 50S contém 34 proteínas e as moléculas de *rRNA* 5S e 23S *rRNA*.

A subunidade 30S contém 21 proteínas e a molécula de *rRNA* 16S. O *rRNA* 16S tem sido a molécula mais amplamente empregada para desenvolver a filogenia dos procaríotos.

Em particular, a análise da sequência de RNA ribossomal fornece uma ferramenta poderosa para a identificação dos microrganismos. A alta especificidade e a natureza cumulativa dos bancos de dados de sequências de RNA ribossômico têm incentivado a

descoberta e o reconhecimento desta biodiversidade.¹⁸ O gene 16S *rRNA* tem regiões de consenso que são identificadas por todas as bactérias, e regiões de variabilidade que são específicas de grupos e espécies particulares. Dentro destas regiões variáveis há também pequenas áreas de hipervariabilidade que podem ser únicas para diferentes cepas de um mesmo organismo.

Portanto, a sequência do gene que codifica o *rRNA* pode ser usada para identificar espécies diferentes e cepas de uma espécie particular dentro de uma comunidade bacteriana mista complexa usando tecnologia em série^{14,18}. Nos últimos anos, uma nova abordagem de análise do gene 16S *rRNA* tem reescrito a maneira como entendemos o microbioma intestinal. A metodologia de alta eficiência, ou high throughput, permite o sequenciamento por síntese de uma grande quantidade de amplicons de uma mesma amostra, o que aumenta a profundidade de análise do microbioma¹⁷.

COLONIZAÇÃO DO RECÉM-NASCIDO

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que, ao nascimento, as mucosas do recém-nascido seriam estéreis e que a colonização ocorreria progressivamente durante e após o parto¹⁹. Porém, vários estudos têm demonstrado a presença de bactérias em amostras de placenta, líquido amniótico e mecônio, principalmente bactérias do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, frequentemente encontradas no microbioma intestinal materno. Desta forma, acredita-se que membros do microbioma materno são translocados para o feto via corrente sanguínea, inviabilizando a teoria do nascimento estéril²⁰.

Porém, apesar desta evidência de colonização intra-útero, sabe-se que a carga microbiana que o recém-nascido recebe na hora do parto é fundamental para o estabelecimento de um microbioma dito saudável na vida do indivíduo. Bebês nascidos de parto normal apresentam um microbioma mais diverso, predominantemente relacionado com o microbioma vaginal materno, com *Lactobacillus* e *Prevotella*, e crianças nascidas de parto cesáreo apresentam um microbioma predominantemente associado ao ambiente, com bactérias encontradas na pele, como *Staphylococcus* e *Propionibacterium*. Assim, bebês nascidos de parto cesáreo estão mais suscetíveis a interferências do ambiente hospitalar, apresentando um microbioma não tão saudável como aquele apresentado por bebês nascidos de parto normal¹⁹.

Sabe-se que as primeiras bactérias que colonizam o TGI parecem ter importante papel na regulação da colonização subsequente. Essas bactérias iniciais podem modular a expressão gênica das células epiteliais do hospedeiro, criando, assim, um ambiente favorável para elas mesmas e prevenindo o crescimento de outras bactérias introduzidas posteriormente.

Desta maneira, a qualidade da colonização inicial do intestino teria, possivelmente, papel crítico no processo de seleção entre os diferentes gêneros bacterianos, trazendo consequências para toda a vida^{5,21}.

De maneira geral, as bactérias anaeróbias facultativas, como *E. coli*, *E. faecalis* e *E. faecium*, são as primeiras bactérias a colonizarem o TGI do recém-nascido nas primeiras horas após o parto, devido ao elevado teor de oxigênio que existe inicialmente. À medida que estas bactérias consomem o oxigênio, o meio se torna mais adequado para as bactérias anaeróbias estritas (*Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium*), que intensificam sua colonização em 7 a 10 dias após o parto.

Depois disso, a identidade e a época de entrada dos outros componentes do ecossistema digestivo do recém-nascido ainda estão sendo reveladas, e parecem estar relacionadas à amamentação e ao ambiente no qual o bebê está inserido²².

O desenvolvimento do microbioma intestinal é afetado pela região geográfica em que a criança nasce²³. De acordo com a hipótese da higiene, práticas mais rigorosas de higiene adotadas em países desenvolvidos podem modificar a exposição microbiana inicial, e, conseqüentemente, o padrão da microbiota intestinal desses recém-nascidos, causando impacto negativo sobre a regulação imunológica, possivelmente levando à maior incidência de doenças alérgicas e autoimunes observadas nesses países.

Em países desenvolvidos, com alto índice de higiene, como a Suíça, as crianças têm uma alta prevalência de *Staphylococcus*, fortemente associada à transmissão pela pele dos pais. Nesses estudos, a detecção de *Staphylococcus* e *Streptococcus* no segundo dia de vida sugere que a possível transferência deste microrganismo seja derivada inicialmente da microbiota vaginal materna, que posteriormente foram substituídas por bactérias provenientes da pele dos pais e do ambiente²⁴.

Na Europa, um estudo multicêntrico mostrou a prevalência de *Bifidobacterium* e *Bacteroides* na microbiota de crianças de seis semanas de vida, amamentadas exclusivamente com leite materno²⁵.

Em países em desenvolvimento, a exposição acentuada a bactérias do ambiente pode induzir um padrão de colonização instável e favorecer a presença de bactérias potencialmente patogênicas em números relevantes. Nessas sociedades, a amamentação materna exclusiva é importante para desenvolver uma microbiota com baixo potencial patogênico.

Altas taxas de colonização pelo gênero *Escherichia*, principalmente nos primeiros meses de vida, foram descritas praticamente de forma unânime pelos primeiros estudos que analisaram a instalação da microbiota em recém-nascidos, tendo sido observadas em diferentes países em desenvolvimento ao redor do mundo, como Guatemala, Paquistão e Brasil²⁶.

Mecanismos regulatórios gerados dentro do intestino (como imunidade e condições físico-químicas do meio) e forças externas (tipos de nutrientes, contaminação ambiental e uso de antimicrobianos) permitem a presença continuada de alguns tipos de microrganismos e a eliminação de outros⁵.

Assim, as bactérias favorecidas por esses mecanismos regulatórios dividem o ambiente intestinal com muitos outros gêneros bacterianos, compondo a comunidade bacteriana. Alterações neste equilíbrio poderão ser observadas em condições patológicas, como por ocasião de infecções intestinais, uso de antibióticos e tratamento imunossupressor⁵. Em recém-nascidos, o leite materno é o mais importante modulador da composição da microbiota²⁷.

Porém, sabe-se que cada criança tem um padrão único e variável de colonização; esse fato se explica pelas condições diversas às quais cada uma foi exposta no decorrer dos primeiros meses de idade.

A administração de antibióticos durante os primeiros meses de vida do bebê pode causar alterações significativas na composição do microbioma fecal, porém, essa alteração depende do antibiótico, dose e tempo de administração, o que torna difícil chegar-se a uma conclusão do exato impacto na composição do microbioma. Nesta faixa etária, sabe-se que antibióticos diminuem a frequência de *Bifidobacterium* e aumentam a frequência de *Enterococcus* e enterobactérias. Alguns estudos apontam para um crescimento significativo da colonização por *Klebsiella* sp^{2,28}.

Os estudos apontam que há uma tendência de se recuperar o padrão do microbioma com o término da administração do antibiótico. Porém, há algumas correlações entre o uso de antibiótico nos primeiros meses de idade e o desenvolvimento de doenças como asma e outras doenças alérgicas, sugerindo que possam ocorrer alterações não detectáveis na composição da microbiota neste período, mas que terão consequências em longo prazo sobre o sistema imunológico e seu desenvolvimento^{5,13}.

O LEITE MATERNO

Durante as primeiras semanas de vida, o microbioma do bebê modifica-se conforme o tipo de leite administrado, fórmula infantil ou leite materno. Crianças amamentadas ao seio tem maiores quantidades de *Lactobacilos* e *Bifidobacterium* nas fezes.

O leite materno não é estéril e contém diversos tipos de bactérias como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e diversas espécies de *Lactobacilos* e *Bifidobacterium* ²⁰.

A colonização do leite tem diferentes origens, como a boca do bebê num fluxo retrógrado no momento da amamentação, a pele da mãe, e o microbioma intestinal materno. Alguns estudos sugerem que as bactérias do microbioma intestinal materno chegam aos ductos mamários carregadas pelos macrófagos via circulação, caracterizando o eixo entero-mamário²⁹.

A importância dos *Lactobacilos* e *Bifidobacterium* no microbioma intestinal consiste na inibição competitiva com outras bactérias pela adesão à mucosa intestinal e na síntese de compostos que inibem ou destroem bactérias patogênicas. Seus efeitos na imunomodulação da mucosa intestinal ocasionam aumento da atividade das células *natural-killer* e produção de macrófagos que ativam fagócitos, promovendo a secreção da IgA ^{4,5}. A permeabilidade intestinal diminui, assim como possíveis reações de hipersensibilidade³.

PAPEL DA LACTOSE E OLIGOSACARÍDEOS DO LEITE MATERNO

O principal carboidrato (CHO) do LM é a lactose (5,3-7 g/dL que consiste em 70% dos CHO), responsável por 50% do seu conteúdo energético³⁰.

O leite materno maduro contém aproximadamente 30 tipos de galacto-oligosacarídeos na concentração de 5-13g/dL e maiores concentrações no colostro (24g/L). Parte da lactose e oligossacarídeos não sofre a ação enzimática digestiva e penetra diretamente no intestino, servindo de substrato ("*fator bifidus*") para o crescimento dos *Lactobacilos* e *Bifidobactérias* através do processo fermentativo. Além da acidificação do meio intestinal e da geração dos AGCCs, os oligossacarídeos promovem a modulação do sistema linfóide associado ao intestino (GALT), prevenindo a translocação bacteriana e reações alérgicas^{31,32}.

O trofismo intestinal promovido pelos AGCC oriundos da fermentação de CHO complexos da dieta estimula a proliferação e a diferenciação celular do epitélio intestinal, protegendo-o da translocação de bactérias patogênicas (através da acidificação do meio intestinal) e evitando doenças inflamatórias e neoplásicas que podem acometer este órgão^{3,10}.

A Organização mundial de Saúde (OMS) preconiza a amamentação exclusivamente com leite materno até os seis meses de idade da criança. Essa idade relaciona-se com o desenvolvimento da capacidade motora da criança de deglutir alimentos não líquidos³³. Porém, sabe-se que durante a amamentação exclusivamente com leite materno, as células epiteliais da mucosa intestinal estão afrouxadas, permitindo uma maior eficiência na absorção de macromoléculas do leite materno, como as imunoglobulinas, por exemplo.

Além disso, durante esse tempo, a microbiota intestinal do bebê é modulada pela microbiota do leite materno, bem como pela fermentação dos oligossacarídeos do leite, como visto acima³⁰. A introdução de alimentos não líquidos nesse período pode afetar esse equilíbrio, interferindo na modulação benéfica da microbiota do bebê²⁵.

A introdução de fórmulas infantis na amamentação do bebê também é um tema bastante conhecido. As fórmulas infantis não possuem todos os carboidratos complexos encontrados no leite materno, porém algumas delas contêm combinações de oligossacarídeos, como os galacto-oligossacarídeos (GOS) e fruto-oligossacarídeo (FOS)⁵.

Inúmeros estudos têm mostrado o efeito destes compostos na modulação da microbiota intestinal. Bebês amamentados com fórmulas infantis possuem uma reduzida colonização de bactérias lácticas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e uma predominância de *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Bacteroides* e enterobactérias¹³.

Uma amamentação mista, com leite materno e fórmula infantil, ajuda a manter os níveis elevados de colonização por *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, apesar de ser em menor proporção quando comparado com crianças amamentadas exclusivamente com leite materno^{5,13}.

A introdução de alimentos sólidos ao bebê caracteriza-se por uma fase de transição na microbiota intestinal. Nesta fase de desmame, novos gêneros bacterianos são introduzidos na microbiota com a alimentação, e um novo padrão de modulação e competição microbiana se estabelece²⁵.

Nesta etapa, os componentes da dieta são fundamentais para manter o equilíbrio na sucessão ecológica que acontece na microbiota. A fermentação de CHO no cólon é dependente tanto da presença de bactérias específicas quanto da presença de potenciais substratos para a fermentação.

Há indícios de que o bebê desenvolve parcialmente a capacidade de fermentar carboidratos não-digeríveis por conta do trabalho conjunto de bactérias da microbiota que degradam inicialmente os alimentos, expondo os CHO não-digeríveis, os quais serão fermentados por outro grupo de bactérias⁵.

A introdução de alimentos sólidos com novos CHO não digeríveis, os quais nunca haviam sido parte da dieta anterior, é um importante fator que induz às principais alterações observadas na composição da microbiota intestinal⁵.

Nos últimos anos, os trabalhos mostram que a composição da microbiota muda com a introdução de alimentos sólidos, com o aumento da diversidade bacteriana e a prevalência de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Bactérias anaeróbias facultativas, como *Bifidobacterium*, continuam dominantes na microbiota, principalmente nos bebês que ainda são amamentados com leite materno, porém em menor abundância³⁴.

EUBIOSE E DISBIOSE NO INÍCIO DA VIDA

Como visto anteriormente, o microbioma intestinal apresenta-se de forma estável e equilibrada ao longo do trato digestório (eubiose). As alterações no padrão do microbioma intestinal podem incorrer em profundas alterações na composição e diversidade das bactérias ocasionadas pela falta de aleitamento materno, sepse bacteriana, jejum prolongado, ambiente da UTI neonatal e uso de medicamentos, como antibióticos e inibidores da acidez gástrica (bloqueadores H2 e inibidores da bomba de prótons).

A disbiose rompe o delicado mecanismo imune intestinal e favorece o crescimento e a translocação de bactérias patogênicas para a corrente sanguínea³.

Estudos sequenciais do microbioma intestinal em prematuros que desenvolveram enterocolite necrosante (ECN) demonstram que ocorre diminuição da diversidade bacteriana intestinal com predominância do Filo Proteobacteria fortemente associada à incidência de ECN. Este Filo inclui uma grande variedade de patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* etc...), além de outras bactérias Gram-negativas que contêm na membrana celular compostos lipopolissacarídeos fortemente associadas com exacerbação da reação inflamatória intestinal³⁵. As mudanças dos Filos bacterianos durante a internação do prematuro estão associadas à predisposição da ECN³⁶.

A disbiose está presente em outras patologias do sistema digestório no período neonatal, como na onfalocele e gastrosquise (defeitos congênitos do fechamento da parede abdominal). As alterações do microbioma decorrentes das correções cirúrgicas, jejum, nutrição parenteral e uso de antibióticos ocasionam a falta de diversidade e concentração do microbioma intestinal como apresentado na figura 437, onde verifica-se acentuada perda da diversidade bacteriana.



Figura 1- Proporção relativa de bactérias na microbiota intestinal de Recém-Nascidos com onfalocele e gastrosquisena na UTI Neonatal (n=11)³⁷

PROBIÓTICOS E SUAS APLICAÇÕES CLÍNICAS NO PERÍODO NEONATAL E A LACTENTES

Neste período da vida, utilizam-se como probióticos especialmente as espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; os principais probióticos utilizados estão demonstrados no quadro 1.

Quadro 1- Principais probióticos utilizados em pediatria

<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus planatarum 299 V</i>
<i>L. reuteri</i>
<i>L. rhamnosus (LGG)</i>
<i>Bifidobacteria sp: bifidum longa lactis infantis</i>
<i>Streptococcus termophilus</i>
<i>Enterococcu faecium SF 86</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>

Há diversas possibilidades de uso terapêutico de probióticos no recém-nascido e lactente. Considerando as afecções do sistema digestório, a modificação da microbiota pode ser utilizada na prevenção e no controle da diarreia infantil. As cepas utilizadas comumente incluem *Lactobacillus casei* e *L. reuteri*. Verificou-se que *B. lactis* ou *L. reuteri*, quando utilizados na diarreia por rotavírus, ocasionaram diminuição no volume e duração da diarreia.

As mesmas cepas foram estudadas na prevenção da diarreia associada ao uso de antibióticos. O efeito benéfico verificado foi redução no risco relativo de 28,5% para 11,9% em episódios diarreicos em crianças que utilizavam antibióticos⁸.

Um estudo multicêntrico teve o objetivo de verificar as propriedades da administração de *L. reuteri* a lactentes em relação a alguns sintomas do aparelho digestório como cólicas, constipação intestinal e regurgitação, motivo comum de ansiedade dos pais e que geram demasiadas consultas ao pediatra. Com frequência, utilizam-se medicamentos e/ou troca das fórmulas infantis, o que gera aumento de custos para as famílias.

Os pesquisadores verificaram que, no grupo onde administrou-se o *L. reuteri*, ocorreu diminuição significativa dos episódios de cólica e aumento no número de evacuações dos lactentes, diminuindo a obstipação intestinal.

Este efeito gerou melhor custo-benefício no tratamento das condições apontadas e reforça a possibilidade da administração de probióticos isolados ou adicionados às fórmulas infantis³⁸.

Há grande interesse no uso de probióticos para prevenção e tratamento da alergia. A revisão Cochrane⁷ avaliou 12 estudos randomizados com 2080 crianças, porém com grande heterogeneidade de casuística e cepas utilizadas. Houve aparente redução no eczema atópico. Estes resultados parecem promissores, no entanto, ainda não há evidências suficientes para indicação de probióticos na prevenção e controle da alergia.^{7,8,39}

Uma das indicações mais promissoras do uso de probióticos é na prevenção da enterocolite necrosante (ECN) em prematuros. Diversas metanálises têm demonstrado potencial na prevenção da ECN⁴⁰⁻⁴².

Quanto à intervenção terapêutica, algumas coortes de estudos multicêntricos, como o *ProPrem study group* na Austrália e Nova Zelândia⁴³ e o multicêntrico norte americano de Janvier e col.⁴⁴, demonstraram diminuição da ECN em prematuros quando associações de probióticos foram utilizadas.

No entanto, ressalte-se que há discussões a respeito da indicação do probiótico ou associações que apresentam melhor eficácia na diminuição da ECN.

Há a necessidade de estabelecer eficácia e segurança no seu uso além de identificar qual microrganismo e dose de inoculação seriam mais eficazes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do microbioma intestinal no início da vida abre um importante campo no conhecimento da fisiopatologia e terapêutica de diversas patologias intestinais graves do recém-nascido, como a ECN, e na prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis no decorrer da vida.

Certamente, a possibilidade de identificação do microbioma intestinal através da técnica de extração do DNA permitirá um diagnóstico mais preciso e terapêutica mais eficaz através da combinação de pré e probióticos mais adequados à situação clínica.

Ações desenvolvidas na UTI Neonatal, como a nutrição enteral mínima e o aleitamento materno, são imprescindíveis para a instalação de uma microbiota saudável, uma vez que o leite materno extraído fresco é a maior fonte natural de probióticos e, certamente, contém a composição e concentração bacteriana adequada e individualizada para cada RN.

Talvez os efeitos benéficos da chamada “colostroterapia” sejam decorrentes da colonização precoce do trato digestório do prematuro associada ao fornecimento das imunoglobulinas, em especial a IgA secretória.

Enquanto não houver uma definição de qual probiótico ou associações probióticas são mais eficazes e seguros para diminuir a incidência de ECN, certamente a presença da mãe na UTI neonatal e a oferta do seu leite à sua criança devem ser incentivadas.

Outro aspecto importante é o uso de medicamentos, em especial antibióticos e inibidores da secreção gástrica, que podem selecionar a microbiota intestinal diminuindo sua diversidade e ocasionando crescimento exagerado de Filos bacterianos como *Proteobacteria*, que apresentam intensa atividade inflamatória. Protocolos de atendimento devem disciplinar o uso destes medicamentos na UTI neonatal visando minimizar este problema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012, 148(6):1258-70.
2. Taddei CR, Oliveira FF, Duarte RTD, Talarico ST, Takagi EH, Carvalho I IR, Gomes FMS, Brandt K, Martinez MB. High Abundance of Escherichia During the Establishment of Fecal Microbiota in Brazilian Children. *Microbial Ecology*, 2014, 67:624-634.
3. Peterson LA, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 14, 141-146 (2014).
4. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Natures Reviews Immunology* 2010, 10:159-169.
5. Scholtens PA, Oozeer R, Martin R, Amor KB and Knol J. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2012, 3:425-47.
6. Vael C. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Current Opinion in Pediatrics* 2009, 21:794-800.
7. ESPGHAN Committee on Nutrition: Supplementation of Infant Formula with Probiotics and/or Prebiotics: A Systematic Review and Comment by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *JPGN* 2011, 52: 238-250
8. Thomas DW, Frank R. Greer, American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, And Nutrition. Probiotics and Prebiotics In Pediatrics. *Pediatrics* 2010, 126:1217-1231.
9. Kaplan JL and Walker AW. Early gut colonization and subsequent obesity risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012, 15:278-284.
10. Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, Ducatelle R, Zabielski R, Van Immerseel F. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews* 2010, 23(2):366-84.
11. Galperin MY. Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes *Microbiol Spectr*. 2013 December ; 1(2): TBS-0015-2012
12. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB, Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010, 90:859-904.

13. Salminen SJ, Gueimonde M. In: O. Hernell, J. Schmitz (eds) Feeding during late infancy and early childhood: impact on Health. Vevey/S. Karger AG, Basel. Nestlé Nutr Workshop Ser Pediatr Program. 2005, 56:43–56.
14. Furrie, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut* 2006, 55(2):141-143.
15. Morais MB, Jacob CMA. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Jornal de Pediatria* 2006, 82(5):189-197.
16. Tannock, G. W. Molecular assessment of intestinal microflora. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001, 73:410s-414s.
17. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR, Coming age, 10 ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 2016, 17:333–351.
18. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 2014, 12:635–645.
19. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habits in newborn. *PNAS* 2010, 107:11971-11975.
20. Funkhouser, L. J. & Bordenstein, S. R. 2013. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol*, 11, e1001631.
21. Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days – intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol* 2014, 25:428–438.
22. Taddei CR, K. Brandt, M. Carneiro-Sampaio. Microbiota Humana. In *Microbiologia*. L. R. Trabulsi e F. Alterthum. 6ª Edição, R. de Janeiro. Editora Atheneu.
23. De Filippo CD, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet Jb, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS* 2010, 107:14691-14696.
24. Adlerberth I and AE Wold. Reduced Enterobacterial and Increased Staphylococcal Colonization of Infantile Bowel: An Effect of Hygienic Lifestyle? *Pediatric Research* 2006, 59(1):96-101.

25. Fallani M, A. S., Uusijarvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, Gil A, Vieites Jm, Norin E, Young D, Scott Ja, Doré J, Edwards Ca; Infabio Team. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology* 2011,157:1385-1392.
26. 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*. 2012, 67:113-123.
27. Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, and Rodríguez JG. Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. *APPL. Environ. Microbiol* 2009, 75(4):965-969.
28. Tanaka S, Kobayashi T, Songjinda P, Tateyama A, Tsubouchi M, Kiyohara C, et al.. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 2009:56,80-87.
29. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmaceutical Research* 2013, 69(1): 1-10.
30. Barile D and Rastall RA. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current Opinion in Biotechnology* 2013, 24:214–219.
31. Moreno Villares JM. Prebióticos em las fórmulas para lactantes. *Na Pediatr (Barc)*. 2008, 68(3):286-94
32. Sherman PM, Cabana M, Gibson GR, Koletzko BV, Neu J, Veereman-Wauters G, Ziegler EE, Walker WA. Potential Roles and Clinical Utility of Prebiotics in Newborns, Infants, and Children: Proceedings from a Global Prebiotic Summit Meeting, *J Pediatr* 2009, 155:S61-70.
33. World Health Organization. Indicators for assessing infant and young child feeding practices. Part I: definition. Geneva: World Health Organization, 2008.
34. Talarico ST, Santos FE, Brandt K, Martinez MB, Taddei CR. Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. *Clínicas* 2016. In press.
35. Gritz EC, Bandhari V. The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Frontiers in Pediatrics* 2015, 3:17.

36. Aujoulat F, Roudière L, Picaud JC, Jacquot A, Filleron A, Neveu D, et al. Temporal dynamics of the very premature infant gut dominant microbiota. *BMC Microbiology* 2014,14:325.
37. Taddei CR and Feferbaum R. - dados em publicação 2016.
38. Indrio F, Di Mauro A, Riezzo G, Civardi E, Intini C, Corvaglia L, et al. Prophylactic use of a probiotic in the prevention of colic, regurgitation, and functional constipation: a randomized clinical trial. *JAMA Pediatr.* 2014 Mar;168(3):228-33.
39. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2003, 361:1869-71.
40. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evid.-Based Child Health* 2014,9(3):584–671.
41. Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of Probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics* 2010,125:221-30.
42. Lau CSM, Chamberlain RS. Probiotic administration can prevent necrotizing enterocolitis in preterm infants: A meta-analysis. *Journal of Pediatric Surgery* 2015, 50(8):1405-1412.
43. Jacobs SE, Tobin JM, Opie GF, Donath S, Tabrizi SN, Pirota M, et al. Probiotic effects on late-onset sepsis in very preterm infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics* 2013, 132:1055-62.
44. Janvier A., Malo J, Barrington KJ. Cohort Study of Probiotics in a North American Neonatal Intensive Care Unit. *J Pediatr* 2014, 164:980-5.

Diretoria/Conselho

Presidente do Conselho Científico e de Administração (Chair)

Dr. Franco Lajolo (FCF - USP)

Vice-Presidente do Conselho Científico e de Administração (Vice-Chair)

Dr. Flavio Ailton Duque Zambroni (IBTOX)

Presidente

Ary Bucione (DuPont)

Vice-Presidente e Diretor Financeiro

Ilton Azevedo (Coca-Cola)

Diretoria

Adriana Matarazzo (Danone)

Alexandre Novachi (Mead Johnson)

Elizabeth Vargas (Unilever)

Dr. Helio Vannucchi (FM USP / RP)

Kathia Schmider (Nestlé)

Dra. Maria Cecília Toledo (FEA - UNICAMP)

Dr. Mauro Fisberg (UNIFESP)

Dr. Paulo Stringheta (UFV)

Diretora Executiva

Flavia Goldfinger

Conselho Científico e de Administração

Adriana Matarazzo (Danone)

Alexandre Novachi (Mead Johnson)

Amanda Poldi (Cargill)

Ary Bucione (DuPont)

Dra. Bernadette Franco (FCF - USP)

Dr. Carlos Nogueira de Almeida (FM - USP/RP)

Deise M. F. Capalbo (EMBRAPA)

Dra. Elizabeth Nascimento (FCF - USP)

Elizabeth Vargas (Unilever)

Dr. Félix G. Reyes (FEA - UNICAMP)

Dr. Flavio Ailton Duque Zambrone (IBTOX)

Dr. Franco Lajolo (FCF - USP)

Dr. Helio Vannucchi (FM - USP / RP)

Ilton Azevedo (Coca-Cola)

Dra. Ione Lemonica (UNESP/Botucatu)

Dr. João Lauro Viana de Camargo (UNESP/Botucatu)

Karen Cristine Ceroni Cazarin (BASF S/A)

Kathia Schmider (Nestlé)

Dra. Maria Cecília Toledo (FEA - UNICAMP)

Dr. Mauro Fisberg (UNIFESP)

Othon Abrahão (Futuragene)

Dr. Paulo Stringheta (UFV)

Dr. Robespierre Q. da Costa Ribeiro (Sec. do Estado de Minas Gerais)

Taiana Trovão (Mondelez)

Tatiana da Costa Raposo Pires (Herbalife)

Empresas Mantenedoras da Força-Tarefa Nutrição da Criança 2017

Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.

BASF S/A

Danone Ltda.

Mead Johnson

Nestlé Brasil Ltda.

