

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO ENTERAL
NA MICROBIOTA INTESTINAL DO RECÉM-NASCIDO
PRÉ-TERMO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ADRIANA ZANELLA

Porto Alegre, Brasil

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO ENTERAL
NA MICROBIOTA INTESTINAL DO RECÉM-NASCIDO
PRÉ-TERMO**

ADRIANA ZANELLA

Orientador: Prof. Dr. Renato S. Procianoy

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Zanella, Adriana
INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO ENTERAL NA MICROBIOTA
INTESTINAL DO RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO / Adriana
Zanella. -- 2018.
86 f.
Orientador: Renato Soibermann Procianoy.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Recém-Nascido. 2. Microbiota. 3. Alimentação.
I. Procianoy, Renato Soibermann, orient. II. Título.

ADRIANA ZANELLA

**INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO ENTERAL NA MICROBIOTA INTESTINAL
DO RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente.

Porto Alegre, 17 de setembro de 2018.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado: Influência da nutrição enteral na microbiota intestinal do recém-nascido pré-termo, elaborada por Adriana Zanela, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Elsa Regina Justo Giugliani (Departamento de Pediatria /PPGSCA - Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Profa. Dra. Maria Luzia Chollopetz Da Cunha (Departamento de Pediatria/Escola de Enfermagem - Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Profa. Dra. Luciana Friedrich (Departamento de Pediatria /PPGSCA - Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Às **famílias e crianças** que participaram dessa pesquisa.
A todas as pessoas que mesmo não citadas participaram e que, de alguma forma, contribuíram
para esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador **Prof. Dr. Renato S. Procianoy**, à **Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia dos Santos Silveira**, à **Pesquisadora colaboradora Prof^ª. Dr^ª. Andréa L. Corso** e **Prof. Luiz F.W. Roesch**, pela oportunidade de realizar esta pesquisa na Unidade de Neonatologia do Hospital de Clínicas (HCPA) de Porto Alegre, pelo incentivo, pela disponibilidade e pelos conhecimentos compartilhados em todos os momentos.

À **secretária Rosane Blanguer**, pela competência, pelo desempenho e pelo profissionalismo nas questões administrativas durante a jornada.

Aos **meus pais, à minha irmã, a meu esposo e à minha filha**, que me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos, dando-me motivação, sem eles, não seria possível.

A toda a **equipe da Neonatologia**, em especial, à **equipe de Enfermagem, Serviço de Neonatologia** do HCPA, que, sem a contribuição e o auxílio deles, não seria possível.

Aos **amigos e familiares** que entenderam a minha ausência em alguns momentos e tiveram paciência comigo; pelo carinho e pela atenção.

Aos **pacientes** e a **suas famílias**, por oportunizarem a coleta dos dados necessários para essa pesquisa.

Ao apoiado da **Fundação Bill e Melinda Gates, CNPQ e DECIT / Ministério da Saúde do Brasil**;

A **todas as pessoas** que, de alguma forma, colaboraram neste projeto.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A colonização precoce do intestino neonatal é influenciada pelas práticas de alimentação. A diversidade da microbiota fecal durante a permanência em Unidade de Terapia Intensiva de recém-nascidos (RN) alimentados com leite humano é pouco estudada.

OBJETIVO: Determinar as diferenças na microbiota fecal dos prematuros recém-nascidos (PRN), considerando o uso de leite materno exclusivo e de fórmula láctea, ao longo dos primeiros 28 dias de vida.

MÉTODO: Foram incluídos 62 PRN com IG \leq 32 semanas, distribuídos em cinco grupos, conforme regime alimentar: 7 PRN com leite materno exclusivo, 8 PRN com fórmula láctea exclusiva, 16 PRN com alimentação mista $>$ 70% de leite materno próprio, 16 PRN com alimentação mista $>$ 70% de fórmula láctea, e 15 PRN com alimentação mista 50% de leite materno próprio e 50% de fórmula láctea. Critérios de exclusão: infecções congênitas, malformações congênitas e RNs de mães usuárias de drogas. As fezes foram coletadas semanalmente durante os primeiros 28 dias de vida. Todos os espécimes fecais foram dissolvidos em glicerol 1:1 e imediatamente congelados a -80 °C até extração de DNA microbiano, para amplificação do gene 16 S rRNA e seu sequenciamento. Os dados foram analisados por estatística descritiva e analítica.

RESULTADOS: Os grupos foram semelhantes em dados perinatais e neonatais. Diferenças significativas na diversidade da comunidade microbiana nos tratamentos foram encontradas ($p < 0,001$), principalmente entre o uso de leite materno exclusivo quando comparado à dieta com fórmula láctea exclusiva (33%) e a $>$ 70% de fórmula láctea (37%). A dieta por leite materno exclusivo permitiu maior diversidade microbiana (média de 85 *Operational Taxonomic Unit* – OTUs), enquanto a $>$ 70% de fórmula láctea a menor diversidade (média de 9 OTUs). Demais grupos apresentaram uma média da diversidade microbiana de 29 OTUs para dieta com fórmula láctea exclusiva, 23 OTUs para $>$ 70% de leite materno próprio, e 25 OTUs para 50% de leite materno próprio e 50% fórmula láctea. A proporção média do gênero *Escherichia* foi sempre maior em tratamentos contendo fórmula láctea do que no tratamento com leite materno exclusivo.

CONCLUSÃO: A microbiota fecal no período neonatal de PRN alimentados com leite materno exclusivo possui maior diversidade bacteriana do que os alimentados com fórmula láctea. Sugerimos que a microbiota fecal determinada pelo uso do leite materno próprio pode ser protetora contra várias morbidades neonatais.

Palavras-chave: Recém-nascido. Microbiota. Alimentação.

ABSTRACT

BACKGROUND: Early colonization of neonatal gut is influenced by feeding practices. Fecal diversity during NICU stay of newborns fed with human milk is poorly studied. **OBJECTIVE:** To determine the differences in preterm infants' stool microbiota considering the use of exclusive own's mothers milk and formula feeding along the first 28 days of life. **METHODS:** We included newborns with GA \leq 32 weeks divided in 5 group according the feeding regimen: 7 exclusive own's mother milk, 8 exclusive preterm formula, 16 mixed feeding with $>70\%$ own's mothers milk, 16 mixed feeding with $>70\%$ preterm formula, and 15 mixed 50% own's mother milk and preterm formula. Exclusion criteria: congenital infections, congenital malformations and newborns of drug addicted mothers. Stools were collected weekly during the first 28 DOL. All specimens were mixed with glycerol 1:1 and immediately frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until microbial DNA extraction, 16 S rRNA amplification and sequencing. **RESULTS:** All groups were similar in perinatal and neonatal and neonatal data. There were significant differences in microbial community among treatments. Those differences were further confirmed by the permutational multivariate analysis of variance. Approximately 33% and 37% of the variation in distance between microbial communities could be explained by the treatment with maternal milk only compared to diets based exclusively or preferentially in formula, respectively. Alpha diversity measurements indicated significant differences ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test) among the diversity of OTUs within treatments. The diet Composed by maternal milk only allowed for greater microbial diversity (average of 85 OTUs). The formula based group presented the smallest diversity (average of 9 OTUs). Those diets based in exclusive formula and preferably maternal milk presented an average of 29 and 23 OTUs respectively; and the diet based in a mixture of formula and maternal milk presented an average of 25 OTUs. The mean proportion of the genus *Escherichia* was always greater in treatments containing formula than in the treatment with maternal milk only. **CONCLUSIONS:** Fecal microbiota in the neonatal period of preterm infants fed with exclusive own's mother milk has increased diversity and a genus composition different from those fed with formula. We suggest that fecal microbiota determined by use of own's mother milk may be protective against several neonatal morbidities.

Keywords: Newborn. Microbiota. Feeding.

This study was supported by a grant from Bill and Melinda Gates Foundation, CNPQ and DECIT/Ministério da Saúde do Brasil.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1A - Comparações da diversidade beta entre as comunidades microbianas encontradas em amostras fecais de alimentos para recém-nascidos prematuros com diferentes dietas durante 28 dias. Coordenadas principais (PCoA)..... 56
- Figura 1B - Comparações da diversidade beta entre as comunidades microbianas encontradas em amostras fecais de alimentos para recém-nascidos prematuros com diferentes dietas durante 28 dias. Medição da dispersão multivariada. 56
- Figura 2 - Diversidade de comunidades microbianas (número de Unidades Taxonômicas Operacionais – OTUs) medidas em amostras fecais de alimentos para recém-nascidos prematuros com diferentes dietas durante 28 dias..... 58
- Figura 3 - Abundância relativa do *phyla* principal detectado nas amostras fecais de recém-nascidos prematuros com dietas diferentes durante 28 dias. 59
- Figura 4 - Abundância microbiana diferencial entre as comunidades microbianas detectadas em amostras de recém-nascidos prematuros alimentados com diferentes dietas durante 28 dias. 60

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | Caracterização da amostra | 54 |
| Tabela 2 - | Desfechos conforme grupo em estudo | 55 |
| Tabela 3 - | Análise de variância permutativa multivariada | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| % | Percentual |
| < | Menor |
| > | Maior |
| ± | Mais ou menos |
| ≤ | Menor ou igual |
| ≥ | Maior ou igual |
| °C | Graus Celsius |
| 1 x | Uma vez |
| 1 ^a | Primeira |
| 2 ^a | Segunda |
| AA | Aminoácidos |
| ABO | Grupos sanguíneos existentes no ser humano: A, B, AB e O |
| AIG | Adequado à idade gestacional |
| ANOVA | Análise de Variância |
| APGAR | <i>Activity</i> (tônus muscular); P - <i>Pulse</i> (frequência cardíaca); G - <i>Grimace</i> (prontidão reflexa); A - <i>Appearance</i> (coloração da pele); R - <i>Respiration</i> (respiração) |
| ATB | Antibiótico |
| AZ | Adriana Zanella |
| B. BREVE | Bifidobactérias breve |
| B. INFANTIS | Bifidobactérias infantis |
| B. <i>LONGUM</i> | Bifidobactérias <i>longum</i> |
| BCP | Broncopneumonia |
| BR | Bolsa rota |
| C/ | Com |
| CEP | Comitê de Ética e Pesquisa |
| CHAD | Concentrado de hemácias |
| CLASSIF. IG/P | Classificação idade gestacional/peso |
| CM | Centímetro |
| COMP | Comprimento |
| CORRIG. | Corrigida |

| | |
|------------|--|
| CPAP | Equipamento de pressão positiva contínua nas vias aéreas |
| CRP | Proteína C-reativa |
| CTC | Compressões torácicas contínuas |
| DBP | Displasia broncopulmonar |
| DGGE | Electroforese em gel de gradiente desnaturante |
| DHM | Donor human milk |
| DM | <i>Diabetes Mellitus</i> |
| DMG | <i>Diabetes Mellitus gestacional</i> |
| DMH | Doença da membrana hialina |
| DN | Data de nascimento |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DP | Desvio padrão |
| DR. | Doutor |
| DRA. | Doutora |
| DSLNT | Disialyllacto-N-tetraose |
| DV | Dias de vida |
| DX | Diagnóstico |
| ECN | Enterocolite necrosante |
| ECO | Ecografia |
| ESTREPTO B | Estreptococos do grupo B |
| F | Valor F por permuta |
| FA | Fosfatase alcalina |
| FL | Fórmula |
| FLE | Fórmula láctea exclusiva |
| FLEBO | Flebotomia |
| FM | Mmisto (fórmula láctea e leite materno) |
| G | Gramas |
| GE | Bioanalyzer e o kit Agilent High Sensitivity |
| GI | Gastrointestinal |
| H | Hora |
| HAC | Hiperplasia adrenal congênita |
| HCPA | Hospital de Clínicas de Porto Alegre |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HMC | Hemocultura |

| | |
|-------------|----------------------------------|
| HPIV | Hemorragia peri-intraventricular |
| IC | Intervalo de confiança |
| IG | Idade gestacional |
| IGO | Idade gestacional obstétrica |
| IGP | Ballard |
| INF. OVULAR | Infecção ovular |
| INO | Oxido nítrico inalatório |
| ITU | Infecção no trato urinário |
| KG | Quilogramas |
| LA | Líquido amniótico |
| LM | Leite materno |
| LMD | Leite materno de doador |
| LME | Leite materno exclusivo |
| LNFP1 | Lacto-N-fucopentose 1 |
| LPM | Leite da própria mãe |
| LPV | Leucomalácia periventricular |
| MASC | Masculino |
| MBM | Leite materno próprio |
| MCE | Massagem cardíaca |
| MIN | Minutos |
| ML | Mililitro |
| MOM | Leite materno |
| N | Número |
| NÃO MBM | Leite humano e/ou fórmula |
| NPP | Nutrição parenteral plena |
| NPT | Nutrição parenteral |
| O2 | Oxigênio |
| OEA | Otoemissão acústica |
| OLG | Oligossacarídeos |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OTUS | Operational Taxonomic Units |
| PB | Perímetro abdominal |
| PC | Perímetro cefálico |

| | |
|----------------|---|
| PCA | Persistência do canal arterial |
| PCOA | Coordenadas principais |
| PCR | Proteína C-reativa |
| PFL | Prevalência de fórmula láctea |
| PICC | Cateter venoso central de inserção periférica |
| PIG | Pequeno para a idade gestacional |
| PLM | Prevalência de leite materno |
| PN | Peso nascimento |
| PRN | Prematuros recém-nascidos |
| PRONT | Prontuário |
| PT | Perímetro torácico |
| R ² | Porcentagem de variação explicada pelas dietas |
| RN | Recém-nascidos |
| ROP 1 | Retinopatia da prematuridade grau 1 |
| ROP 2 | Retinopatia da prematuridade grau 2 |
| ROP 3 | Retinopatia da prematuridade grau 3 |
| ROP 4 | Retinopatia da prematuridade grau 4 |
| ROP 5 | Retinopatia da prematuridade grau 5 |
| ROP | Retinopatia da prematuridade |
| RRNA | Gene do RNA ribossomal |
| S | Segundos |
| SD | Média |
| SEM | Semanas |
| SM | Seio materno |
| SNAPPE II | Score for Neonatal Acute Physiology with Perinatal Extension-II |
| SP | Sala de parto |
| SPSS | <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> |
| SURFA | Surfactante |
| TAX | Temperature axillar |
| TCPAPN | Tempo de CPAP nasal |
| TET | Tubo endotraqueal |
| TRAT. | Tratamento |
| TTRN | Taquipneia transitória do recém-nascido |

| | |
|----------|--|
| UNIPAMPA | Universidade Federal do Pampa |
| UTI | Unidade de tratamento intensivo |
| UTIN | Unidades de terapia intensiva neonatal |
| VM | Ventilação mecânica |
| VMAF | Ventilação mecânica de alta frequência |
| VPP | Ventilação por pressão positiva |

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 222 |
| 3 JUSTIFICATIVA..... | 29 |
| 4 OBJETIVOS | 30 |
| 5 HIPOTESE DE TRABALHO | 31 |
| 6 METODOLOGIA | 32 |
| 6.1 DELINEAMENTO | 32 |
| 6.2. POPULAÇÃO A SER ESTUDADA | 32 |
| 6.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO | 32 |
| 6.4 LOGÍSTICA | 32 |
| 6.4.1 Análises laboratoriais da microbiota intestinal..... | 33 |
| 6.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO | 36 |
| 6.5.1 Variável dependente..... | 366 |
| 6.5.2 Variáveis independentes..... | 36 |
| 6.6 SELEÇÃO DA AMOSTRA..... | 37 |
| 6.7 CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS | 38 |
| 6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 39 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 40 |
| 8 ARTIGO ORIGINAL..... | 46 |
| 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 68 |
| APÊNDICE A - PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS | 69 |
| APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 72 |

1 INTRODUÇÃO

Os fetos são essencialmente estéreis durante a gestação, mas, durante e após o nascimento, a superfície corporal, incluindo boca, pele e intestino, tornam-se hospedeiros para uma variedade de micróbios, bactérias, fungos e vírus. (MORGAN *et al.*, 2012). Tal visão tem sido questionada nos últimos anos graças às descobertas recentes de bactérias ou DNA bacteriano no sangue do cordão umbilical, placenta e mecônio, sugerindo exposição *in utero* a bactérias. (MARTIN *et al.*, 2016)

A microbiota intestinal tem papel importantíssimo no desenvolvimento das funções gastrointestinais pós-natais dos seres humanos. Pesquisas têm apresentado resultados significativos no que se refere às complexas relações existentes entre a microbiota, a barreira intestinal, o sistema imunológico e o eixo intestino-cérebro, principalmente no tocante ao recém-nascido. (FANARO *et al.*, 2003)

Microbiota é o conjunto de todos os microrganismos (incluindo bactérias, *archaea*, eucariontes e vírus) que colonizam um hospedeiro em várias regiões, como o trato digestório. (SOMMER *et al.*, 2013) A microbiota intestinal se instala no indivíduo ao nascimento, permanecendo até sua morte. Dentre as funções da microbiota, estão: moldar os genes envolvidos na fortificação da barreira da mucosa, promover a angiogênese e contribuir para a maturação intestinal pós-natal. Outra função importante da microbiota consiste na sua capacidade imunomoduladora, pois atinge uma variedade de vias de sinalização de modulação das respostas imunes, inflamatórias e alérgicas. Sob circunstâncias normais, esses microrganismos auxiliam na digestão e manutenção do sistema imune; entretanto, uma disfunção na microbiota humana tem sido associada a condições que variam desde doenças inflamatórias a infecções resistentes a antibióticos. (MORGAN *et al.*, 2012)

No recém-nascido, a microbiota apresenta grande variabilidade interindividual e se desenvolve rapidamente logo após o nascimento, sendo dependente de diversas condições, como tipo de parto, grau de imaturidade, uso de antibióticos pela mãe, oferta de leite materno ou fórmula láctea, uso de antibiótico para tratamento da sepse neonatal precoce, entre outras possíveis situações que promovem essa variabilidade. (TURNBAUGH *et al.*, 2007; MADAN *et al.*, 2012)

A microbiota é essencial para um desenvolvimento normal do trato gastrointestinal (GI) e tem um papel importante no funcionamento da barreira da mucosa intestinal e na homeostase local. Acredita-se que, no recém-nascido, uma microbiota saudável é aquela que proporciona uma redução do risco de infecção e envia sinais adequados ao intestino para a maturação imunológica, ou seja, o estabelecimento de uma microbiota saudável possui um efeito profundo sobre o futuro bem-estar do recém-nascido. Existem várias situações que podem influenciar esse processo, entre eles, o tipo de alimentação. Um dos fatores conhecidos, com importante papel no estabelecimento da microbiota intestinal, é o leite materno (ARBOLEYA *et al.*, 2012).

O processo de colonização e formação da microbiota intestinal pode ser dividido em fases (SATOKARI *et al.*, 2009). A primeira fase começa com o nascimento e as primeiras horas de vida; a segunda fase se refere ao período do início da alimentação, (amamentação com leite materno ou fórmulas lácteas); e a terceira fase diz respeito à introdução de alimentos sólidos na dieta da criança (desmame) (LANGHENDRIES *et al.*, 2006).

A microbiota intestinal pode ser afetada pelo tipo de dieta, porque ela possui diferentes substratos destinados à fermentação bacteriana. Verificou-se que existe relação entre a composição da microbiota intestinal e a incidência de infecções entre crianças amamentadas ou que receberam fórmulas lácteas (PARRACHO *et al.*, 2007).

Um equilíbrio dinâmico existente entre a microbiota GI e a dieta, a qual influencia na aquisição inicial do ecossistema intestinal, além do seu desenvolvimento e estabilidade (MSHVILDADZE *et al.*, 2010a). No nascimento, o recém-nascido vai ser exposto a uma avalanche de novos micróbios e o intestino começa a ser gradualmente colonizado. Os primeiros micróbios colonizadores são anaeróbios facultativos, como as enterobactérias, coliformes, lactobacilos e estreptococos, seguidos no segundo/terceiro dia de vida por anaeróbios, como as bifidobactérias, bacteroides, clostrídios e eubactérias. As bifidobactérias mais comumente presentes nas fezes infantis são *B. longum*, *B. infantis* e *B. breve* (ROGER *et al.*, 2010a; ROGER *et al.*, 2010b).

A colonização intestinal é modulada não apenas por bactérias do ambiente, mas também pelo tipo de dieta. O leite materno contém microrganismos vivos, especialmente bifidobactérias e bactérias produtoras de ácido láctico, e um espectro de substâncias bioativas. Após o desmame, a microbiota intestinal continua a se desenvolver em direção ao padrão *adulto-like*. Este processo é afetado por hábitos alimentares, estado de saúde e condições sanitárias (COLLADO *et al.*, 2012). A microbiota das crianças amamentadas é menos complexa quando comparadas aos lactentes que receberam fórmulas lácteas, com predominância das bifidobactérias (até 90% da total população bacteriana) e membros da família *Enterobacteriaceae* (ORRHAGE *et al.*, 1999). Para aqueles alimentados com fórmulas lácteas, verifica-se o predomínio de colonização semelhante ao do adulto (*adulto-like*), com maior frequência e níveis mais elevados de *Enterobacteriaceae* e enterococos (HARMSSEN *et al.*, 2000).

Embora vários autores analisem as comunidades bacterianas em crianças, os estudos com a microbiota neonatal são limitados, o que se deve, em parte, ao fato de que as técnicas clássicas utilizadas no passado só permitiam a identificação de um número restrito de bactérias (HARMSSEN *et al.*, 2000; SCHWIERTZ *et al.*, 2003; COLLADO *et al.*, 2012).

Atualmente, a classificação taxonômica e a identificação do perfil molecular dos microbiomas são possíveis por meio do sequenciamento do gene 16S, que é altamente conservado na subunidade pequena do gene do RNA ribossomal (rRNA) bacteriano, possibilitando a identificação de micróbios anteriormente indetectáveis. Tal abordagem permite uma imagem mais completa da composição intestinal da microbiota humana (WANG *et al.*, 2009).

Os padrões da colonização entérica em neonatos prematuros se diferem em ambiente de cuidados intensivos, quando comparados ao padrão da colonização de recém-nascidos a termo saudáveis amamentados (WESTERBEEK *et al.*, 2006; PENDERS *et al.*, 2006). PRN apresentam padrões de colonização microbiana imunes e modestos que podem estabelecer bases para riscos de doenças imunológicas para toda a vida. Os processos infecciosos maternos ocorridos no parto e, como ocorre em algumas situações, a seriedade considerável da doença após o nascimento prematuro, seguidamente, promovem o uso de antibióticos precoces e de grande espectro no PRN (CLARK *et al.*, 2006; COTTEN *et al.*, 2009;). A administração e a demora no início da alimentação enteral podem interferir no tipo e na quantidade de microrganismos que colonizam o trato GI (WESTERBEEK *et al.*, 2006; DETHLEFSEN *et al.*, 2008; COTTEN *et al.*, 2009;). Os resultados a curto e longo prazo de alterações do microbioma intestinal em desenvolvimento em PRN são muito desconhecidos, mas existem chances significativas para modificar e regularizar o microbioma intestinal e, assim, diminuir o risco de doenças por meio de terapias pré e probióticas, entre outras práticas (HSIEH *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2008).

Ao se investigar o desenvolvimento do microbioma bacteriano intestinal em PRN de baixo peso com risco para sepse, com o uso do pirosequenciamento 454, independente de cultura, se observou que os PRN de baixo peso ao longo do tempo realçaram os padrões de colonização anteriores à sepse tardia, resultados esses que promovem a correlação entre os

padrões de colonização e as mudanças na diversidade com fatores clínicos. Outra constatação se refere à de que o mecônio não é estéril e que possui baixa diversidade desde o nascimento em bebês que desenvolveram sepse tardia. Por fim, verificou-se que o uso de antibióticos empíricos e prolongados reduz a diversidade microbiana intestinal e promove uma microbiota suscetível a doenças (MADAN *et al.*, 2016).

Apesar de existirem poucos dados de pesquisa em humanos, estudos em animais sugerem que a microbiota intestinal durante o período neonatal tem um profundo efeito sobre o estado nutricional, o desenvolvimento do trato gastrointestinal (GI) e a manutenção da integridade da superfície da mucosa intestinal (HOOPER *et al.*, 2001; CAICEDO *et al.*, 2005; DETHLEFSEN *et al.*, 2016). Em estudo prévio, no qual dados sobre a composição da microbiota intestinal em crianças prematuras nascidas com 32 semanas de IG foram investigados, os resultados, amparados em técnicas de não cultura mostraram que a microbiota em prematuros apresenta grande variabilidade interindividual, que se desenvolve muito rapidamente após o nascimento. As primeiras amostras de fezes apresentaram uma diversidade bacteriana diferente conforme a IG no parto, o uso de antibiótico na gestante, ruptura prolongada das membranas, e, também, ao tipo de alimentação (leite materno contra fórmula láctea) (MSHVILDADZE *et al.*, 2010a). Não foram encontradas diferenças significativas em amostras iniciais entre cesárea e parto normal (HUURRE *et al.*, 2008; MSHVILDADZE *et al.*, 2010a). Na comparação da microbiota fecal dos lactentes antes do desenvolvimento de processos inflamatórios, tais como enterocolite necrosante (ECN) ou sepse, com pirosequenciação 454, apareceram diferenças no padrão de colonização. Um dos resultados que utiliza tanto *electroforese em gel de gradiente desnaturante* (DGGE) e pirosequenciação 454 é a acentuada variabilidade de composição microbiana entre lactentes, no entanto, persistiu ao longo do tempo uma tendência para o aumento da diversidade. Nas amostras coletadas antes do início dos sintomas da doença e analisadas por

alto rendimento de sequenciamento de rRNA 16S, foram encontradas correlações entre a presença/ausência de grupos de bactérias específicas e o estado da doença no futuro. Cada recém-nascido prematuro desenvolveu uma composição da microbiota diferente da de outros, mesmo em gêmeos (MSHVILDADZE *et al.*, 2010a). Outra constatação diz respeito à tendência para menos diversidade nas primeiras fezes de recém-nascidos cujas mães receberam antibióticos, diferença esta que diminuiu ao longo do tempo. O efeito dos antibióticos pós-natais não pôde ser determinado porque a maioria dos prematuros recebeu antibióticos nos primeiros dias de vida pós-natal (MSHVILDADZE *et al.*, 2010a; MSHVILDADZE *et al.*, 2010b). O uso rotineiro de antibióticos no prematuro foi recentemente associado a uma maior chance de desenvolver ECN (MSHVILDADZE *et al.*, 2010 b; TORRAZZA *et al.*, 2013).

Nos primeiros 6 meses de vida, o aleitamento materno é considerado a melhor nutrição para recém-nascidos (GARTNER *et al.*, 2005). Nas unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN), para fornecer aos recém-nascidos os benefícios do leite materno, tem se tornado cada vez mais comum oferecer o leite materno de doador (LDM), quando o leite da própria mãe (MOM) não está disponível ou em falta, para que eles recebam um pouco dos benefícios fornecido pelo leite materno (TULLY *et al.*, 2000). Existe uma pluralidade de compostos bioativos no leite materno, cuja quantidade e composição são dependentes dos fatores genéticos e ambientais, que podem sofrer alterações ao longo do período de lactação. Quando o leite materno é modificado (pasteurizado), ele age como protetor do recém-nascido recebedor contra os agentes patógenos (SPRINGER *et al.*, 1997; SPRINGER *et al.*, 2000; HUMAN MILK BANKING ASSOCIATION OF NORTH AMERICA. GUIDELINES, 2009; GROVSLIEN *et al.*, 2009; CAROLIN, 2013).

Os RN se beneficiam, em diversos graus, dos oligossacarídeos existentes no leite humano, pois esses constituem um grupo de compostos bioativos do leite (KUNZ *et al.*, 2000;

NEWBURG *et al.*, 2005); são prebióticos e antimicrobianos, atuam como agentes modeladores da constituição da microbiota intestinal, e, ainda, podem agir em parceria direta com as células epiteliais do intestino do recém-nascido (ANGELONI *et al.*, 2005; KUNTZ *et al.*, 2008; KUNTZ *et al.*, 2009); e também articular as respostas imunes celulares (BODE *et al.*, 2004; EIWEGGER *et al.*, 2004), tal como fornecer ao RN o ácido siálico, nutriente indispensável para o progresso do encéfalo e da cognição (WANG *et al.*, 2009). Os oligossacarídeos, após a lactose e os lipídeos, são os elementos que existem em maior quantidade no leite materno humano (CAROLIN *et al.*, 2013).

O leite materno tem sido largamente e gradativamente recomendado para a alimentação de prematuros na UTIN, mas os seus benefícios para a saúde nem sempre são comparáveis a dos RNs que recebem leite materno oriundos da própria mãe. Há uma diferença significativa na composição OLG do leite materno de doador e do leite materno das mães com recém-nascidos na UTIN. Tais diferenças possibilitam a existência de implicações significativas no que se refere aos resultados da saúde de recém-nascidos a termo e pré-termo (CAROLIN *et al.*, 2013).

Diversos fatores podem afetar a colonização do intestino neonatal, dentre eles, o tipo de dieta. Uma colonização intestinal anormal nas primeiras semanas de vida pode modificar as funções da barreira imunológica do hospedeiro e, conseqüentemente, aumentar o risco à doença. Um melhor entendimento sobre a colonização microbiana do trato GI no período neonatal é essencial, principalmente para os recém-nascidos pré-termo, pois interações entre a microbiota e o seu hospedeiro têm conseqüências importantes para a saúde futura (SAAVEDRA *et al.*, 2012).

2 REVISÃO DA LITERATURA

O corpo humano possui milhões de microrganismos que funcionam em parceria com as nossas próprias células a fim de influenciar a qualidade de nossa saúde ao longo da vida (ZEISSIG *et al.*, 2014; HOUGHTLING *et al.*, 2015). Tais microrganismos são denominados de microbiota ou microbioma, e suas ações contribuem para a formação do sistema imunológico, endócrino e neural dos seres humanos. Apesar de uma grande variedade de microrganismos florescer na pele, na cavidade oral e no trato urogenital, os que estão no intestino são os mais diversificados e abundantes, e suas funções são as mais bem compreendidas (YANG *et al.*, 2016).

A microbiota intestinal é muito importante para o metabolismo, desenvolvimento e comportamento dos seres humanos (HMPC, 2012; CABREIRO *et al.*, 2013; BÄCKHED *et al.*, 2015). Estudos que abordam esta temática e sua relação com doenças de alta complexidade (HMPCS, 2012; LI *et al.*, 2014; BÄCKHED *et al.*, 2015) restringiram-se apenas à sua enumeração de microbiota baseada em cultura, perfilhamento genético (16S) e/ou utilização de amostras pequenas, o que deixa claro que os fatores que formam a microbiota intestinal não foram examinados a contento (DOMINGUEZ *et al.*, 2010; SUBRAMANIAN *et al.*, 2014; BÄCKHED *et al.*, 2015).

O desenvolvimento da microbiota dos recém-nascidos (RN) depende de fatores médicos e dietéticos (LA ROSA, *et al.*, 2014; BÄCKHED *et al.*, 2015), mas não se sabe ainda como eles influenciam a sua composição geral e a sua cooperação entre si (BÄCKHED *et al.*, 2015). Os estudos baseados em amostras fecais de lactentes e suas mães contribuem para o acompanhamento de cada estágio cronológico e funcional no decorrer do primeiro ano de vida (BÄCKHED *et al.*, 2015; GREGORY *et al.*, 2016).

A constituição do microbioma intestinal infantil é influenciada por fatores como o tipo de nascimento, ingestão de antibióticos, ambiente de cuidados e exposições nutricionais, e, por fim, amamentação, que merece destaque (DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2010; BROOKS *et al.*, 2014; ARDESHIR *et al.*, 2014; GREGORY *et al.*, 2016; BOIX-AMORÓS *et al.*, 2016).

Além desses fatores, nos PRN, a IG ao nascimento e a idade pós-natal também contribuem para o desenvolvimento do microbioma intestinal. RN a termo possuem bactérias específicas que favorecem a sua saúde, as chamadas bactérias "pioneiras" (LA ROSA *et al.*, 2014; HOUGHTELING *et al.*, 2015).

A influência do leite materno *versus* fórmula láctea na formação da microbiota, sobretudo sobre os genes enterocitários, contribui para a proteção e o desenvolvimento do hospedeiro, em que o verdadeiro impacto do leite materno na composição do microbioma intestinal do prematuro ainda é desconhecido (HOUGHTELING *et al.*, 2015).

O microbioma intestinal infantil do prematuro sofre a influência de fatores como tempo pós-natal, IG, peso ao nascer e exposições nutricionais (KHODAYAR-PARDO *et al.*, 2014; HOUGHTELING *et al.*, 2015; CABRERA-RUBIO *et al.*, 2016; YASMIN *et al.*, 2017). No caso específico da alimentação com leite materno, este parece encobrir a influência do peso ao nascer, o que sugere uma função protetora contra a imaturidade intestinal do recém-nascido prematuro em seu início de vida (HOUGHTELING *et al.*, 2015). Essas descobertas sugerem não apenas a existência de um mecanismo microbiano subjacente ao conjunto de evidências que elucidam que o leite materno propicia a saúde intestinal do recém-nascido prematuro (CACHO *et al.*, 2017), mas, inclusive, a interação dinâmica dos fatores hospedeiros e dietéticos que ajudam na colonização e no enriquecimento de micróbios específicos durante o estabelecimento da sua microbiota intestinal (HOUGHTELING *et al.*, 2015).

Estudos com o leite materno identificaram um grupo em comum de nove espécies bacterianas presentes em todas as amostras coletadas, mas com diferentes concentrações entre os indivíduos, demonstrando que cada indivíduo doador apresentou um único microbioma do leite que era estável ao longo do tempo, o que levou à conclusão de que cada mãe possui um conjunto de micróbio específico destinado à saúde do seu recém-nascido (CAPORASO *et al.*, 2012; CACHO *et al.*, 2017). Grande parte das mães de recém-nascidos muito prematuros possui a capacidade de produzir, mesmo que em pequena quantidade, seu próprio leite, que, apesar de não ser o suficiente para satisfazer as necessidades nutricionais diárias do prematuro, ainda mantém os benefícios à saúde desse (CAPORASO *et al.*, 2012).

A microbiota GI dos recém-nascidos consiste no reflexo mais próximo do leite de suas mães do que de mães não aparentadas, o que indica que os micróbios do leite humano provavelmente colonizam o trato GI de forma precoce e podem compor a base do microbioma GI infantil (PANNARAJ *et al.*, 2017; PANNARAJ *et al.*, 2018). Tal relação é importante, pois se desenvolve por meio da ingestão do leite humano pelo recém-nascido, visto que possui a capacidade não apenas de transferir bactérias, mas também vírus (LY, *et al.*, 2016; COLUMPSI, *et al.*, 2016). Diante disso, os viomas do leite humano e fezes infantis de uma coorte de pares mãe-filho foram mapeados com o objetivo de: caracterizar o vioma do leite, identificar semelhanças e diferenças na diversidade do vírus no leite e nas fezes infantis, decifrar se o leite e os viroides das fezes infantis são similares em seus táxon e, por fim, estabelecer em que medida os vírus podem ser transmitidos para o trato GI da criança por meio do leite (PANNARAJ *et al.*, 2017). O estudo identificou diferenças significativas na microbiota bacteriana em diferentes superfícies corporais, porém o leite e as fezes infantis apresentaram algumas das diferenças mais significativas na constituição dos viomas observados (PANNARAJ *et al.*, 2018).

A predominância relativa de *Siphoviridae* nas fezes dos lactentes se relacionada com a predominância de *Myoviridae* no leite foi significativa. Mesmo que as características taxonômicas representem diferenças de estilo de vida entre as populações virais, em que os vírus no leite têm estilos de vida mais predominantemente líticos quando comparados com estilos de vida mais lisogênicos nas fezes infantis, tais diferenças também podem representar as diferenças na taxonomia bacteriana, em que *Bacteroidese Veillonella* foram predominantes nas fezes infantis e que podem ter sido mais propensas a ter vírus da família *Siphoviridae*. Diante disso, os dados apresentados reforçam que o leite materno pode contribuir com parte dos vírus encontrados no trato GI da criança, o que aumenta ainda mais o potencial complexo do microbioma intestinal no desenvolvimento infantil, pois foi identificado um viroma único no leite que pode ser transferido ao recém-nascido (PANNARAJ *et al.*, 2018).

Em outro estudo, foram explorados os padrões diários do microbioma intestinal em recém-nascidos prematuros em UTIN (Unidade de Terapia Intensiva Neonatal), e se investigou a relação entre os fatores clínicos (demografia infantil, tipo de parto, tipo de alimentação, antibiótico uso, e condições de saúde) e os tipos de colonização microbiana do intestino infantil. Ao sequenciar e analisar as amostras fecais de 29 prematuros nascidos entre 28 e 32 semanas de gestação, foram constatados padrões dinâmicos de desenvolvimento de colonização microbiana GI nos primeiros 30 dias de vida, que diferiram entre homens e mulheres lactentes e entre recém-nascidos alimentados com leite materno próprio (MBM) e aqueles alimentados com leite humano e/ou fórmula láctea (não MBM). A análise da relação entre os tipos de alimentação e o microbioma intestinal infantil, a alimentação com MBM esteve associada à maior diversidade do microbioma intestinal dos recém-nascidos se comparada à alimentação não MBM, incluindo leite humano e/ou fórmula láctea. Os recém-nascidos alimentados por não MBM desenvolveram comunidades menos complexas nos primeiros pontos de amostragem e a taxa crescente de diversidade foi lenta ao longo do

tempo. Os padrões do microbioma intestinal de pré-termo variaram significativamente entre os recém-nascidos e *Proteobacteria* foi o filo mais abundante. Verificou-se que as crianças alimentadas com MBM tiveram um microbioma intestinal relativamente mais diversificado e com maior abundância de *Clostridiales* e *Lactobacillales* do que aqueles alimentados com não MBM (leite de doador humano e/ou fórmula láctea). Já as crianças alimentadas com não MBM desenvolveram um tipo diferente de comunidade de microbioma intestinal em que predominou *Enterobacteriales* durante os primeiros 30 dias de vida precoce. Tais diferenças foram encontradas mesmo entre os recém-nascidos do grupo MBM que receberam leite ou fórmula láctea doadora durante o estudo (CONG *et al.*, 2016).

Além de contribuir para o aumento da microbiota, o leite materno também favorece a prevenção da sepse, enterocolite necrosante (ECN) e outras doenças (FALLANI *et al.*, 2011; CAPORASO *et al.*, 2012; LEMAS *et al.*, 2016; STEARNS *et al.*, 2017).

A ECN consiste em uma das principais causas de morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva neonatal, com a maioria dos casos ocorrendo entre prematuros (LEMAS *et al.*, 2016; STEARNS *et al.*, 2017). O equilíbrio de toda a comunidade microbiana intestinal pode ser crucial para o desenvolvimento de uma microbiota local saudável no recém-nascido, capaz de protegê-lo contra ECN, mostrando uma associação entre a ECN e as distorções no desenvolvimento normal da microbiota (STEARNS *et al.*, 2017).

O conhecimento do número total de bactérias no leite permite o melhor entendimento do comportamento bacteriano em situações de proteção ou de infecções, por exemplo, o que facilitaria o desenvolvimento de mecanismos para a detecção de problemas existentes nos lactentes (HARMSSEN *et al.*, 2000; STEARNS *et al.*, 2017) como já descreveram estudos realizados (FALLANI *et al.*, 2011; CAPORASO *et al.*, 2012; EDGAR *et al.*, 2013; PYLRO *et al.*, 2014; HOUGHTLING *et al.*, 2015; STEARNS *et al.*, 2017).

O microbioma intestinal encontrado no leite materno (MOM) contribui, a curto e longo prazo, para a prevenção da colonização por agentes patogênicos, pois estimula a produção de anticorpos reativos e estabelece um microbioma intestinal saudável capaz de prevenir morbidades em longo prazo, como obesidade, diabetes tipo 2, crônica inflamação intestinal, distúrbios autoimunes, alergia, síndrome do intestino irritável e gastroenterite alérgica (RDCT, 2008; CAPORASO *et al.*, 2012; GRITZ *et al.*, 2015; MURPHY *et al.*, 2017; PAMMI *et al.*, 2017). Muitas mães de recém-nascidos prematuros não conseguem produzir a quantidade suficiente de leite materno para atender totalmente as necessidades nutricionais do seu recém-nascido (CAPORASO *et al.*, 2012).

Outro estudo se propôs a determinar a associação entre o leite materno, a pele areolar e as comunidades bacterianas intestinais, a partir de um estudo prospectivo e longitudinal, que identificou a composição com o sequenciamento do gene do RNA 16S ribossômico no leite materno, pele areolar e amostras de fezes infantis de 107 pares mãe-recém-nascido saudáveis, em que constataram que os lactentes amamentados receberam 27,7% das bactérias intestinais do leite materno e 10,4% da pele areolar durante o primeiro mês de vida. A diversidade bacteriana e as alterações da composição foram associadas à proporção de ingestão diária de leite materno de forma dependente da dose, mesmo após a introdução de alimentos sólidos. Os resultados deste estudo indicam que as bactérias no leite materno contribuem para o intestino do lactente, ressaltando a importância da amamentação no desenvolvimento do microbioma intestinal infantil (PANNARAJ *et al.*, 2017).

Desde o nascimento, a microbiota intestinal apresenta três funções essenciais: protetor, em que os microrganismos intestinais servem como barreira que afasta a proliferação dos organismos patogênicos; metabólico, já que desempenham um papel importante na digestão e no metabolismo do colostro, do leite materno, da fórmula láctea, de alimentos do desmame em lactentes e de uma grande variedade de alimentos em adultos, na quebra de toxinas e de

drogas, na síntese de vitaminas e na absorção de íons; e, por fim, trófico, pois incluem o crescimento e a diferenciação das células epiteliais que revestem o lúmen intestinal e a manutenção homeostática do sistema imunológico, incluindo a tolerância aos antígenos alimentares (GUARNER; YANG *et al.*, 2016).

Acreditava-se que o intestino de um recém-nascido era estéril e que o processo de colonização iniciava apenas após o nascimento a partir da microbiota materna, da dieta e do meio ambiente (ARRIETA *et al.*, 2014; MUNYAKA *et al.*, 2014). Tal visão tem sido questionada nos últimos anos graças às descobertas recentes de bactérias ou DNA bacteriano no sangue do cordão umbilical, placenta e mecônio, sugerindo exposição *in útero* a bactérias. A composição da microbiota evolui ao longo do tempo, que é o resultado do impacto combinado de diferentes eventos (ou seja, diferentes tipos de alimentação, modo de entrega e uso de antibióticos). Esses achados podem sugerir que essas bactérias são transitórias no intestino infantil, e podem desempenhar um papel fundamental no amadurecimento do sistema imunológico nos primeiros meses de vida (MARTIN *et al.*, 2016).

Os fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal estão sendo objeto de múltiplos estudos, para que, uma vez conhecidos e entendidos, novas estratégias possam ser desenvolvidas para a manutenção do estado de equilíbrio (CAPORASO *et al.*, 2012; EDGAR *et al.*, 2013; STEARNS *et al.*, 2017; CACHO *et al.*, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

Há evidências crescentes mostrando que a aquisição precoce, o desenvolvimento e a manutenção de populações de bactérias específicas são essenciais para a saúde humana, e uma melhor compreensão destes oferece grandes oportunidades para intervenção (WALKER *et al.*, 2008).

A microbiota constitui um ecossistema extremamente complexo que interage com o hospedeiro e afeta profundamente o trato GI e as funções imunológicas sistêmicas. Padrões microbianos específicos estão associados com crianças e adultos saudáveis, e esses padrões estão relacionados à aquisição de bactérias e ao desenvolvimento de comunidades microbianas intestinais no período perinatal. (FANARO *et al.*, 2003)

As fezes são representantes da microbiota de grande parte do intestino distal (do íleo até região anal), podendo, inclusive, prover uma abordagem confiável da microbiota de sítios mais proximais do trato digestivo. (FANARO *et al.*, 2003) Nosso projeto é inovador na medida em que estamos utilizando o estado da arte 16S rRNA baseada em tecnologia de sequenciamento (MORGAN *et al.*, 2012) para avaliar a microbiota intestinal dos recém-nascidos pré-termo. Não foram localizados estudos avaliando a microbiota intestinal nesse grupo de recém-nascidos de acordo com todos os tipos de dieta recebida, quando esta pesquisa foi realizada (2014-2016).

Os fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal estão sendo objeto de múltiplos estudos, para que, uma vez conhecidos e entendidos, novas estratégias possam ser desenvolvidas para a manutenção do estado de equilíbrio. O conhecimento da microbiota intestinal de acordo com o tipo de alimentação recebida pelo recém-nascido pré-termo poderá inaugurar futuras possibilidades terapêuticas direcionadas à flora intestinal conhecida.

4 OBJETIVO

Determinar as diferenças na microbiota fecal dos prematuros recém-nascidos (PRN), considerando o uso de leite materno exclusivo e de fórmula láctea, ao longo dos primeiros 28 dias de vida.

5 HIPÓTESE DE TRABALHO

A hipótese deste estudo é de que a microbiota intestinal dos recém-nascidos pré-termo apresenta diferenças de acordo com o tipo de alimentação recebida, se leite materno ou fórmula láctea.

6 METODOLOGIA

6.1 DELINEAMENTO

Estudo de coorte prospectivo com amostra de conveniência.

6.2. POPULAÇÃO A SER ESTUDADA

Foram estudados recém-nascidos pré-termo com IG menor ou igual a 32 semanas, nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e internados na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal dessa mesma instituição, entre o período de 2014 a 2016.

6.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- a) recém-nascidos admitidos na neonatologia provenientes de outro hospital;
- b) presença de malformações congênitas ou síndromes genéticas;
- c) infecções congênitas, mães portadoras do vírus HIV.

6.4 LOGÍSTICA

Ao ocorrer um nascimento pré-termo com IG menor ou igual a 32 semanas no Centro Obstétrico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), preenchendo critérios de inclusão; a família foi contatada para solicitar autorização para inclusão na pesquisa, e um número de inclusão foi gerado para iniciar protocolo de coleta de dados (APÊNDICE A). Um termo de consentimento livre e esclarecido foi lido e fornecido para autorizar a inclusão do

filho ou tutelado na pesquisa, com todas as questões de dúvidas esclarecidas pelo pesquisador principal Adriana Zanella (AZ).

Após a autorização concedida, a primeira eliminação de mecônio do recém-nascido foi obtida por meio de coleta estéril e, a seguir, armazenada em tubo estéril com glicerol na diluição 1:1. As amostras foram imediatamente congeladas e armazenadas em botijão criogênico até serem transportados para o laboratório, no qual foi feita a extração do DNA microbiano e a posterior análise da composição da comunidade microbiana. A primeira coleta, obrigatoriamente, ocorreu antes do recém-nascido receber todo e qualquer tipo de alimentação por via enteral, pois as técnicas sugerem diferenças na colonização microbiana de crianças alimentadas com leite materno se comparadas àquelas alimentadas com fórmula láctea. (ROESCH *et al.*, 2007)

Após alimentação enteral, novas amostras de fezes foram coletadas com intervalos de cinco a sete dias, durante toda a permanência hospitalar do recém-nascido. Todas as amostras de fezes foram imediatamente congeladas a -80°C em frascos com tampa rosca adequados para não ocorrer derramamentos até o momento da extração de DNA e a posterior análise da composição da comunidade bacteriana.

6.4.1 Análises laboratoriais da microbiota intestinal

Há diversas etapas nesse processo: técnica de extração do DNA, amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento.

Técnica para extração do DNA

O DNA microbiano total foi extraído a partir de amostras de 200-300mg de fezes usando o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante modificado pela inclusão de uma etapa adicional de lise

mecânica. A pureza do DNA genômico total foi analisada com auxílio de espectrofotômetro tipo NanoVue™ por meio da medição da razão entre absorvância a 260 e 280nm. A concentração do DNA total foi quantificada com o uso de fluorômetro tipo Qubit® 2.0. Em posse da concentração de DNA total, todas as amostras foram diluídas de acordo com aquela de menor concentração para que cada amostra contenha a mesma concentração de DNA. O DNA foi congelado a -80°C até o momento da amplificação do gene 16S e sequenciamento.

Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento

A diversidade, abundância e estrutura das comunidades microbianas foram estimadas com base na metodologia proposta por Roesch e colaboradores. (ROESCH *et al.*, 2007)

Conforme Fulthorpe e colaboradores (FULTHORPE *et al.*, 2008), o sequenciamento do gene 16s foi realizado por meio da plataforma PGM™ ION TORRENT. Para cada amostra de DNA microbiano, foi amplificado o gene 16S a partir dos oligonucleotídeos iniciadores universais, recomendados pelo Human Microbiome Project, 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), para amplificação de microrganismos do domínio Bacteria e Archaea.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados juntamente com os adaptadores A-Key (5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG'3) e P1-Key (5'CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT'3) para a obtenção de uma sequência de oligonucleotídeos iniciadores única (*primer fusion*). Múltiplas amostras foram analisadas em uma única utilização do instrumento PGM™ e, para tanto, foram adicionados, à região 5' dos oligonucleotídeos iniciadores, 10 bases conhecidas (código de barras) que serviram para posterior identificação da origem de cada sequência segundo metodologia proposta por Hamady *et al.* (HAMADY *et al.*, 2008)

O código de 10 bases foi adicionado ao oligonucleotídeo iniciador 806R e o sequenciamento unidirecional foi feito a partir do adaptador A-key. Uma reação de PCR foi

feita para cada DNA isolado das amostras com um diferente código de barras por reação. As condições utilizadas na reação foram: 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 45s para desnaturação, 50°C por 1min. para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, e 72°C por 1,5 min. para extensão; seguidos por 72°C por 10 minutos de extensão final. O produto final das reações de PCR foi purificado com kit para purificação de PCR AgencourtAMPure XP (BeckmanCoulter, Inc.).

A concentração final do DNA produto da PCR foi quantificada por meio do uso do Bioanalyzer e do kit Agilent High Sensitivity (GE) seguindo as recomendações do fabricante. Finalmente, as reações foram combinadas em concentração equimolar para criar uma mistura composta por fragmentos do gene 16S amplificado de cada amostra de DNA. Esta amostra composta foi, então, sequenciada utilizando o chip Ion 316™.

Preparação dos dados para análise

As sequências de nucleotídeos obtidas pelo método descrito acima foram analisadas por meio da utilização de um conjunto de ferramentas de bioinformática sumarizadas no programa computacional PANGEA desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa e disponível para *download* no site <http://pangea-16s.sourceforge.net/>. (HAMADY *et al.*, 2008) Também foi utilizado, para a complementação das análises, os *scripts* disponibilizados no pacote QIIME (GIONGO *et al.*, 2010) ou Mothur (CAPORASO *et al.*, 2010) de acordo com a necessidade da aplicação.

Os passos adotados para a análise foram baseados nas recomendações propostas por Lemos e colaboradores. (LEMOS *et al.*, 2011) As sequências obtidas foram inicialmente avaliadas quanto à qualidade das bases sequenciadas. As bases localizadas na parte terminal da sequência que apresentarem *score* Phred menor ou igual a 25 foram removidas.

Também foram removidas do banco de dados aquelas sequências que apresentarem tamanho inferior a 200 bases e aquelas cujo valor médio do Phred *score* for menor que 27 (em

uma janela de 50 bases). As sequências de boa qualidade foram posteriormente separadas em diferentes grupos de acordo com o código de 10 bases, sendo criado um novo arquivo para as sequências provenientes de cada amostra.

Toda a técnica para extração do DNA, amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento, assim como a classificação filogenética dos genes do 16SrRNA, foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAMPA, sob a responsabilidade do Dr. Luiz Roesh.

6.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO

6.5.1 Variável dependente

- a) análise da microbioma intestinal.

6.5.2 Variáveis independentes

- a) IG: variável contínua (dias) e avaliada pela data da última menstruação confiável ou ultrassom obstétrico precoce, realizado nas primeiras 12 semanas da gestação e confirmada pelo exame clínico neonatal;
- b) Peso nascimento: variável numérica contínua, que foi estratificado em faixas de peso;
- c) Sexo: masculino/feminino;
- d) Escore de Apgar;

- e) Classificação quanto à IG: em Pequeno (PIG) ou Adequado à idade gestacional (AIG), de acordo com as curvas de crescimento intrauterinas empregadas na rotina da Neonatologia;
- f) Dados maternos e obstétricos: tipo de parto, idade materna, presença de bolsa rota superior a 18 horas, infecção urinária materna, corioamnionite, descolamento de placenta;
- g) Morbidades e intercorrências do recém-nascido: presença de doença da membrana hialina, neutropenia, sepse neonatal precoce e tardia, enterocolite necrosante, convulsões, asfixia neonatal, hemorragia peri-intraventricular, alta ou óbito. Diagnóstico de sepse precoce foi determinado pela presença de hemocultura positiva nas primeiras 72 horas de vida e de sepse tardia, hemocultura positiva após 72 horas de vida, acompanhadas de sinais clínicos de infecção;
- h) Tipo de alimentação enteral recebida: leite materno/fórmula láctea/mista (leite materno e fórmula láctea).

Todas essas variáveis foram obtidas pela revisão de prontuários e, longitudinalmente, durante o acompanhamento do recém-nascido na Neonatologia, com o devido registro em ficha protocolo individual (APÊNDICE A).

6.6 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Este estudo baseou-se em uma estratégia de amostragem de conveniência com pacientes recrutados na Seção de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no Brasil.

Os grupos foram separados de acordo com o tipo de alimentação: leite materno exclusivo (LME), fórmula láctea exclusiva (FLE), prevalência de leite materno (PLM), prevalência de fórmula láctea (PFL), e misto (fórmula láctea e leite materno (FM)). Os recém-nascidos que foram alimentados com aleitamento materno *exclusivo* receberam apenas o *leite materno* sem adicionar nenhum outro tipo de líquido. Os que foram alimentados com fórmula láctea exclusiva receberam somente algum tipo de fórmula láctea infantil, sem nenhum tipo de outro alimento. As prevalências de leite materno foram para recém-nascidos que receberam os dois tipos de leite, o materno e algum tipo de fórmula láctea infantil, prevalecendo 70% de leite materno. Já na prevalência de fórmula láctea, receberam os dois tipos de leite, o materno e algum tipo de fórmula láctea infantil, prevalecendo 70% de fórmula láctea infantil. No grupo dos mistos, os recém-nascidos receberam os dois tipos de leite, o materno e algum tipo de fórmula láctea infantil, num percentual de 40-50% de cada tipo.

6.7 CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS

Foram digitados os dados no programa Excel e, posteriormente, exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis categóricas por frequências e percentuais. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e pelo desvio padrão. Foram comparadas as variáveis categóricas pelo teste de Qui-quadrado e as quantitativas pela Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste *post-hoc* de Tukey.

Foi considerado um nível de significância de 5% para as comparações estabelecidas.

6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Atendendo à Resolução 466/2012, que regulamenta a pesquisa com seres humanos, o projeto de pesquisa foi submetido para avaliação quanto aos seus aspectos metodológicos e éticos pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Foi preenchido o Termo de Compromisso para Utilização de Dados, que é fornecido pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA. Deste modo, foi assegurada a confidencialidade das informações contidas nos bancos que possam identificar os indivíduos.

Também foi dado aos pais o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para solicitar a autorização para a coleta de fezes e inclusão no estudo (APÊNDICE B).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELONI, S. *et al.* Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. **Glycobiology**, v. 15, n. 1, p. 31-41, 2005.
- ARBOLEYA, S. *et al.* Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 3, p. 763-72, 2012.
- ARDESHIR, A. *et al.* Breast-fed and bottle-fed infant rhesus macaques develop distinct gutmicrobiotas and immune systems. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 252, p. 252ra120.
- ARRIETA, M. *et al.* The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 427, 2014.
- BÄCKHED, F. *et al.* Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell Host Microbe**, v. 17, p. 690–703, 2015.
- BODE, L. *et al.* Human milk oligosaccharides reduce platelet-neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil beta 2 integrin expression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 4, p. 820-6, 2004.
- BOIX-AMORÓS, A.; COLLADO, M. C.; MIRA, A. Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 492, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de saúde. **Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012.**
- BROOKS, B. *et al.* Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. **Microbiome**, v. 2, p. 1, 2014.
- CABREIRO, F.; GEMS, D. Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, p. 1300-10, 2013.
- CABRERA-RUBIO, R. *et al.* Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 7, p. 54-60, 2016.
- CACHO, N. T. *et al.* Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1470, 2017.
- CAICEDO, R. A. *et al.* The developing intestinal ecosystem: implications for the neonate. **Pediatr Ressearch**, v. 58, n. 4, p. 625-8, 2005.
- CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-6, 2010.
- CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME J**, v. 6, p. 1621–24, 2012.
- CLARK, R. H. *et al.* Reported medication use in the neonatal intensive care unit: data from a large national data set. **Pediatrics**, v. 117, p. 1979–87, 2006.

- COLE, J. R. *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D633–D642, 2014.
- COLLADO, M. C. *et al.* Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. **Gut Microbes**, v. 3, n. 4, p. 352-65, 2012.
- COLUMPSI, P. *et al.* Beyond the gut bacterial microbiota: The gut virome. **Journal of Medical Virology**, v. 88, p. 1467–72, 2016.
- CONG, X. *et al.* Gut Microbiome Developmental Patterns in Early Life of Preterm Infants: Impacts of Feeding and Gender. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0152751, 2016.
- COTTEN, C. M. *et al.* NICHD Neonatal Research Network. Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. **Pediatrics**, v. 123, p. 58–66, 2009.
- DETHLEFSEN, L. *et al.* Assembly of the human intestinal microbiota. **Trends Ecology Evolution**, v. 21, n. 9, p. 517-23, 2006.
- DETHLEFSEN, L. *et al.* The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biology**, v. 6, p. e280, 2008.
- DOMINGUEZ-BELLO, M. G. *et al.* R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 11971-5, 2010.
- EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, p. 996–8, 2013.
- EDGAR, R. C. SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. Sep 09, 2016. **bioRxiv**. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/074161v1>. Acesso em: 27 jan. 2018
- EIWEGGER, T. *et al.* Human milk-derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. **Pediatric Research**, v. 56, n. 4, p. 536-40, 2004.
- FALLANI, M. *et al.* Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. **Microbiology**, v. 157, p. 1385-92, 2011.
- FANARO, S. *et al.* Intestinal microflora in early infancy: composition and development. **Acta Paediatrica Supplement**, v. 91, p. 48-55, 2003.
- FULTHORPE, R. R. *et al.* Distantly sampled soils carry few species in common. **The ISME Journal**, v. 2, n. 9, p. 901-10, 2008.
- GARTNER, L. M. *et al.* Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 115, n. 2, p. 496-506, 2005.
- GIONGO, A. *et al.* PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. **The ISME Journal**, v. 4, n. 7, p. 852-61, 2010.
- GOOD, I. J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, v. 40, p. 237–64, 1953.

- GREGORY, K. E. *et al.* Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. **Microbiome**, v. 4, p. 68, 2016.
- GRITZ, E. C.; BHANDARI, V. The human neonatal gut microbiome: a brief review. **Frontiers in Pediatrics**, v. 3, p. 17, 2015.
- GRØVSLIEN, A. H.; GRØNN, M. Donor milk banking and breastfeeding in Norway. **Journal of Human Lactation**, v. 25, n. 2, p. 206-10, 2009.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, p. 512-9, 2003.
- HAMADY, M. *et al.* Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. **Nature Methods**, v. 5, n. 3, p. 235-7, 2008.
- HARMSSEN, H. J. *et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 61-7, 2000.
- HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v. 292, p. 1115-8, 2001.
- HOUGHTLING, P.; WALKER, W. A. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to the infant's and child's health? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, p. 294-307, 2015.
- HSIEH, M. H.; VERSALOVIC, J. The human microbiome and probiotics: implications for pediatrics. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 38, p. 309-27, 2008.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, p. 207-14, 2012.
- HUMAN MILK BANKING ASSOCIATION OF NORTH AMERICA. **Guidelines for the Establishment and Operation of a Donor Human Milk Bank**. 15. ed. Fort Worth, TX: Human Milk Banking Association of North America, 2009.
- HUURRE, A. *et al.* Mode of delivery -effects on gut microbiota and humoral immunity. **Neonatology**, v. 93, n. 4, p. 236-40, 2008.
- KHODAYAR-PARDO, P. *et al.* Impacto de lactato en el estómago, gestación, edad y modo de entrega sobre la microbiota de la leche materna. **Journal of Perinatology**, v. 34, p. 599-605, 2014.
- KUNTZ, S.; KUNZ, C.; RUDLOFF, S. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 9, p. 1306-15, 2009.
- KUNTZ, S.; RUDLOFF, S.; KUNZ, C. Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 3, p. 462-71, 2008.
- KUNZ, C. *et al.* Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, p. 699-722, 2000.
- LA ROSA, P. S. *et al.* Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 12522-27, 2014.

- LANGHENDRIES, J. P. [Early bacterial colonisation of the intestine: why it matters?]. **Archives de Pédiatrie**, v. 13, n. 12, p. 1526-34, 2006.
- LEMAS, D. J. *et al.* Exploring the contribution of maternal antibiotics and breastfeeding to development of the infant microbiome and pediatric obesity. *Semin. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2016; 21:
- LEMONS, L. N. *et al.* Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 1, p. 42–51, 2011.
- LI, J. *et al.* MetaHIT Consortium. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. **Nature Biotechnology**, v. 32, p. 834-41, 2014.
- LY, M. *et al.* Transmission of viruses via our microbiomes. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 64, 2016.
- MADAN, J. C. *et al.* Association of cesarean delivery and formula supplementation with the intestinal microbiome of 6-week-old infants. **JAMA Pediatrics**, v. 170, n. 3, p. 212-9, 2016.
- MADAN, J. C. *et al.* Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 97, n. 6, p. F456-62, 2012.
- MARTIN, F. J. *et al.* Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. **Molecular Systems Biology**, v. 4, p. 157, 2008.
- MARTIN, R. *et al.* Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. Suchodolski JS, ed. **PLoS One**, v. 11, n. 6, e0158498, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0158498.
- MARX, C. *et al.* Human milk oligosaccharide composition differs between donor milk and mother's own milk in the NICU. **Journal of Human Lactation**, v. 30, n. 1, p. 54-61, 2013.
- McMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: an R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS One**, v. 8, p. e61217, 2013.
- MIURA E.; SILVEIRA, R. C.; PROCIANOY, R. S. [Neonatal sepsis: diagnosis and treatment]. **Jornal de Pediatria**, v. 75, n. 1, p. S57-62, 1999.
- MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human microbiome analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12:e1002808, 2012.
- MSHVILDADZE, M. *et al.* Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 1, p. 20-5, 2010b.
- MSHVILDADZE, M.; NEU, J. The infant intestinal microbiome: friend or foe? **Early Human Development**, v. 86, n. 1, p. 67-71, 2010a.
- MUNYAKA, P. M.; KHAFIPOUR, E.; GHIA, J. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, p. 109, 2014.
- MURPHY, K. *et al.* The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40597, 2017.

- NEWBURG, D. S.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; MORROW, A. L. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, p. 37-58, 2005.
- ORRHAGE, K.; NORD, C. E. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. **Acta Paediatrica**, v. 88, n. 430, p. 47-57, 1999.
- PAMMI, M. *et al.* Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. **Microbiome**, v. 5, p. 31, 2017.
- PANNARAJ, P. S. *et al.* Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 7, p. 647-54, 2017.
- PANNARAJ, P. S. *et al.* Shared and distinct features of human milk and infant stool viromes. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1162, 2018.
- PARRACHO, H.; McCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. Probiotics and prebiotics in infant nutrition. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, n. 3, p. 405-11, 2007.
- PENDERS, J. *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, p. 511-21, 2006.
- PYLRO, V. S. *et al.* Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30-37, 2014.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. 2008.
- ROESCH, L. F. *et al.* Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 1, n. 4, p. 283-90, 2007.
- ROGER, L. C. *et al.* Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 11, p. 3329-41, 2010b.
- ROGER, L. C.; McCARTNEY, A. L. Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 11, p. 3317-28, 2010a.
- SAAVEDRA, J. M.; DATTILO, A. M. Early development of intestinal microbiota: implications for future health. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 41, n. 4, p. 717-31, 2012.
- SATOKARI, R. *et al.* Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 8-12, 2009.
- SCHWIERTZ, A. *et al.* Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. **Pediatric Research**, v. 54, n. 3, p. 393-9, 2003.
- SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 227-38, 2013.
- SPRINGER, S. Human milk banking in Germany. **Journal of Human Lactation**, v. 13, n. 1, p. 65-8, 1997.

- SPRINGER, S. News about human milk banking in Germany. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 478, p. 441-2, 2000.
- STEARNS, J. C. *et al.* Ethnic and diet-related differences in the healthy infant microbiome. **Genome Medicine**, v. 9, p. 32, 2017.
- SUBRAMANIAN, S. *et al.* A persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. **Nature**, v. 510, p. 417-21, 2014.
- TORRAZZA, R. M. *et al.* Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e83304, 2013.
- TULLY, M. R. A year of remarkable growth for donor milk banking in North America. **Journal of Human Lactation**, v. 16, n. 3, p. 235-6, 2000.
- TURNBAUGH, P. J. *et al.* The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804, 2007.
- WALKER, A. W. *et al.* The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 3275-83, 2008.
- WANG, B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. **Annual Review Nutrition**, v. 29, p. 177-222, 2009.
- WANG, Y. *et al.* 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. **ISME**, v. 3, n. 8, p. 944-54, 2009.
- WESTERBEEK, E. A. M. *et al.* The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 361-8, 2006.
- YANG, I. *et al.* The infant microbiome: implications for infant health and neurocognitive development. **Nursing Research**, v. 65, n. 1, p. 76-88, 2016.
- YASMIN, F. *et al.* Cesarean section, formula feeding, and infant antibiotic exposure: separate and combined impacts on gut microbial changes in later infancy. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, p. 200, 2017.
- ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. S. Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. **Nature Immunology**, v. 15, p. 307-10, 2014.

8 ARTIGO ORIGINAL

INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO ENTERAL NA MICROBIOTA INTESTINAL DO RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO

RESUMO

INTRODUÇÃO: A colonização precoce do intestino neonatal é influenciada pelas práticas de alimentação. A diversidade da microbiota fecal durante a permanência em Unidade de Terapia Intensiva de recém-nascidos (RN) alimentados com leite humano é pouco estudada.

OBJETIVO: Determinar as diferenças na microbiota fecal dos prematuros recém-nascidos (PRN), considerando o uso de leite materno exclusivo e de fórmula láctea, ao longo dos primeiros 28 dias de vida.

MÉTODO: Foram incluídos 62 PRN com IG \leq 32 semanas, distribuídos em cinco grupos, conforme regime alimentar: 7 PRN com leite materno exclusivo, 8 PRN com fórmula láctea exclusiva, 16 PRN com alimentação mista > 70% de leite materno próprio, 16 PRN com alimentação mista > 70% de fórmula láctea, e 15 PRN com alimentação mista 50% de leite materno próprio e 50% de fórmula láctea. Critérios de exclusão: infecções congênitas, malformações congênitas e RNs de mães usuárias de drogas. As fezes foram coletadas semanalmente durante os primeiros 28 dias de vida. Todos os espécimes fecais foram dissolvidos em glicerol 1:1 e imediatamente congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até extração de DNA microbiano, para amplificação do gene 16 S rRNA e seu sequenciamento. Os dados foram trabalhados por estatística descritiva e analítica.

RESULTADOS: Os grupos foram semelhantes em dados perinatais e neonatais. Diferenças significativas na diversidade da comunidade microbiana nos tratamentos foram encontradas ($p < 0,001$), principalmente entre uso de leite materno exclusivo quando comparado à dieta com fórmula láctea exclusiva (33%) e a > 70% de fórmula láctea (37%). A dieta por leite materno exclusivo permitiu maior diversidade microbiana (média de 85 *Operational Taxonomic Unit* – OTUs), enquanto a > 70% de fórmula láctea a menor diversidade (média de 9 OTUs). Demais grupos apresentaram uma média da diversidade microbiana de 29 OTUs para dieta com fórmula láctea exclusiva, 23 OTUs para > 70% de leite materno próprio e 25 OTUs para 50% de leite materno próprio e 50% fórmula láctea. A proporção média do gênero *Escherichia* foi sempre maior em tratamentos contendo fórmula láctea do que no tratamento com leite materno exclusivo.

CONCLUSÃO: A microbiota fecal no período neonatal de PRN alimentados com leite materno exclusivo possui maior diversidade bacteriana do que os alimentados com fórmula

lática. Sugerimos que a microbiota fecal determinada pelo uso do leite materno próprio pode ser protetora contra várias morbidades neonatais.

Palavras-chave: Recém-nascido. Microbiota. Alimentação.

ABSTRACT

BACKGROUND: Early colonization of neonatal gut is influenced by feeding practices. Fecal diversity during NICU stay of newborns fed with human milk is poorly studied. **OBJECTIVE:** To determine the differences in preterm infants' stool microbiota considering the use of exclusive own's mothers milk and formula feeding along the first 28 days of life. **METHODS:** We included newborns with GA \leq 32 weeks divided in 5 group according the feeding regimen: 7 exclusive own's mother milk, 8 exclusive preterm formula, 16 mixed feeding with $>70\%$ own's mothers milk, 16 mixed feeding with $>70\%$ preterm formula, and 15 mixed 50% own's mother milk and preterm formula. Exclusion criteria: congenital infections, congenital malformations and newborns of drug addicted mothers. Stools were collected weekly during the first 28 DOL. All specimens were mixed with glycerol 1:1 and immediately frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until microbial DNA extraction, 16 S rRNA amplification and sequencing. **RESULTS:** All groups were similar in perinatal and neonatal and neonatal data. There were significant differences in microbial community among treatments. Those differences were further confirmed by the permutational multivariate analysis of variance. Approximately 33% and 37% of the variation in distance between microbial communities could be explained by the treatment with maternal milk only compared to diets based exclusively or preferentially in formula, respectively. Alpha diversity measurements indicated significant differences ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test) among the diversity of OTUs within treatments. The diet Composed by maternal milk only allowed for greater microbial diversity (average of 85 OTUs). The formula based group presented the smallest diversity (average of 9 OTUs). Those diets based in exclusive formula and preferably maternal milk presented an average of 29 and 23 OTUs respectively; and the diet based in a mixture of formula and maternal milk presented an average of 25 OTUs. The mean proportion of the genus *Escherichia* was always greater in treatments containing formula than in the treatment with maternal milk only. **CONCLUSIONS:** Fecal microbiota in the neonatal period of preterm infants fed with exclusive own's mother milk has increased diversity and a genus composition different from those fed with formula. We suggest that fecal microbiota

determined by use of own's mother milk may be protective against several neonatal morbidities.

Keywords: Newborn. Microbiota. Feeding.

INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é muito importante para o metabolismo, desenvolvimento e comportamento dos seres humanos.^(1,2) Apesar de vários estudos sobre o tema e a sua relação com doenças de alta complexidade^(1,3,4), eles restringiram-se apenas à sua enumeração baseada em cultura, perfilhamento genético (16S) e/ou utilização de amostras pequenas, o que deixa claro que os fatores que formam a microbiota intestinal não foram examinados a contento.^(1,5,6) Sabe-se que o desenvolvimento da microbiota dos recém-nascidos depende de fatores médicos e dietéticos^(1,7), mas não se sabe ainda como eles influenciam a sua composição geral e a sua cooperação entre si.⁽¹⁾ Os estudos baseados em amostras fecais de lactentes e suas mães contribuem para o acompanhamento de cada estágio cronológico e funcional no decorrer do primeiro ano de vida.⁽¹⁾

O corpo humano possui milhões de microrganismos que funcionam em parceria com as nossas próprias células a fim de influenciar a qualidade de nossa saúde ao longo da vida.^(8,9) A constituição do microbioma intestinal infantil é influenciado por fatores como o tipo de nascimento, a ingestão de antibióticos, o ambiente de cuidados e as exposições nutricionais, e, por fim, a amamentação, que merece destaque na formação dela.^(8,10,11,12) Além desses fatores, nos recém-nascidos prematuros, também contribuem para o desenvolvimento do microbioma IG ao nascimento e a idade pós-natal; se sabe que os recém-nascidos a termo possuem bactérias específicas que favorecem a sua saúde, as chamadas bactérias "pioneiras".^(7,8) Apesar de se conhecer a influência do leite materno *versus* fórmula láctea na formação da microbiota, sobretudo sobre os genes enterocitários que contribuem para a proteção e o desenvolvimento do hospedeiro, desconhece-se o verdadeiro impacto do leite materno na composição do microbioma intestinal do prematuro.⁽⁸⁾

O microbioma intestinal infantil do prematuro sofre a influência de fatores como o tempo pós-natal, a IG, o peso ao nascer e as exposições nutricionais.^(8,13,14,15) No caso específico da alimentação com leite materno, este parece encobrir a influência do peso ao nascer, o que sugere uma função protetora contra a imaturidade intestinal do recém-nascido prematuro em seu início de vida.⁽⁸⁾ Essas descobertas sugerem não apenas a existência de um mecanismo microbiano subjacente ao conjunto de evidências que elucidam que o leite

materno propicia a saúde intestinal do recém-nascido prematuro⁽¹⁶⁾, mas inclusive a interação dinâmica dos fatores hospedeiros e dietéticos que ajudam na colonização e no enriquecimento de micróbios específicos durante o estabelecimento da sua microbiota intestinal.⁽⁸⁾

Estudos com o leite materno identificaram grupo em comum de nove espécies bacterianas presentes em todas as amostras coletadas, mas com diferentes concentrações entre os indivíduos, demonstrando que cada indivíduo doador apresentou um único microbioma intestinal do leite que era estável ao longo do tempo, o que levou à conclusão de que cada mãe possui um conjunto de micróbios específicos destinados à saúde do seu recém-nascido.^(16,17) Grande parte das mães de recém-nascidos muito prematuros possui a capacidade de produzir, mesmo que em pequena quantidade, seu próprio leite, que, apesar de não ser o suficiente para satisfazer as necessidades nutricionais diárias do prematuro, ainda mantém os benefícios à saúde desse.⁽¹⁷⁾

Diante disso, pretende-se descrever a microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termo de acordo com o padrão alimentar, estabelecer modificações da microbiota intestinal conforme o tipo da dieta enteral administrada, bem como comparar o perfil da microbiota intestinal do recém-nascido pré-termo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo baseou-se em uma estratégia de amostragem de conveniência com pacientes recrutados na Seção de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no Brasil. Os critérios de inclusão foram os recém-nascidos prematuros com IG de ≤ 32 semanas (a IG foi avaliada por ultrassom) e que tiveram o consentimento por escrito na admissão hospitalar para o parto. Os critérios utilizados para exclusão das mães consistiram em: (1) HIV ou infecções congênitas, (2) dependência ou usuárias de drogas recreativas ou álcool e (3) malformações congênitas no recém-nascido.

Os grupos foram separados de acordo com o tipo de alimentação: leite materno exclusivo (LME), fórmula láctea exclusiva (FLE), prevalência de leite materno (PLM), prevalência de fórmula láctea (PFL), e misto (fórmula láctea e leite materno (FM)). Os recém-nascidos que foram alimentados com aleitamento materno *exclusivo* receberam apenas o *leite materno* sem adicionar nenhum outro tipo de líquido. Os que foram alimentados com fórmula láctea exclusiva receberam somente algum tipo de fórmula láctea infantil, sem nenhum tipo de outro alimento. As prevalências de leite materno foram para recém-nascidos que receberam os dois tipos de leite, o materno e algum tipo de fórmula láctea infantil, prevalecendo 70% de

leite materno. Já na prevalência de fórmula láctea, receberam os dois tipos de leite o materno e algum tipo de fórmula láctea infantil, prevalecendo 70% de fórmula láctea infantil. No grupo dos mistos, os recém-nascidos receberam os dois tipos de leite o materno e algum tipo de fórmula láctea infantil num percentual de 40-50% de cada tipo.

As fezes dos recém-nascidos foram coletadas de fraldas. A coleta foi realizada semanalmente, começando com as primeiras fezes (mecônio), após essa primeira amostra com o intervalo de cinco dias, foi coletada uma amostra por semana, até a quarta semana de vida. Após a coleta, todas as amostras foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido até a extração do DNA.

Os dados clínicos foram separados pela caracterização da amostra e o desfecho. As variáveis foram definidas por meio dos dados maternos e obstétricos como: idade materna variável contínua (anos), avaliada pela data de nascimento; o tipo de parto normal ou cesariana como variável qualitativa nominal; o tempo de bolsa rota em dois tipos: por horas, sendo uma variável quantitativa e com um ponto de corte acima de 18h; o uso de antibióticos durante a internação da mãe antes do parto; se ocorreu pré-eclâmpsia que foi definida como uma síndrome que ocorre na gravidez, com o aumento excessivo da pressão arterial, dores de cabeça persistentes, proteinúria, aumento excessivo do peso, e edema das pernas e dos pés na gestação ou eclampsia, que é caracterizada por convulsões relacionadas à hipertensão arterial; se apresentou coriomionite, que é uma inflamação das membranas fetais (âmnio e córion) devido a uma infecção bacteriana; e se a coleta de estreptococo foi positiva ou negativa nessas mães; peso nascimento: variável numérica contínua; que poderá ser estratificada em faixas de peso; IG: variável contínua (dias) e avaliada pela data da última menstruação confiável ou ultrassom obstétrico precoce, realizado nas primeiras 12 semanas da gestação e confirmada pelo exame clínico neonatal; morbidades e intercorrências do recém-nascido com enterocolite necrosante; sepse, que é uma infecção generalizada que produz um conjunto de manifestações graves em todo o organismo produzidas por uma infecção, a qual pode ser precoce: que foi determinada pela presença de hemocultura positiva nas primeiras 72 horas de vida ou sepse tardia: hemocultura positiva após 72 horas de vida, acompanhadas de sinais clínicos de infecção; o uso de corticoide na gestante antes nascimento do recém-nascido, sendo considerada/s uma ou mais doses; o uso de antibióticos no recém-nascido na primeira semana de vida e na segunda; e óbito sendo uma variável quantitativa.

As considerações éticas atenderam à Resolução 466/2012, que regulamenta a pesquisa com seres humanos; o projeto de pesquisa foi submetido e aprovado quanto aos seus aspectos

metodológicos e éticos pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Foi preenchido o Termo de Compromisso para Utilização de Dados, que é fornecido pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA. Deste modo, foi assegurada a confidencialidade das informações contidas nos bancos que possam identificar os indivíduos. Também foi entregue aos pais o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para solicitar a autorização para a coleta de fezes e inclusão no estudo.

Extração de DNA microbiano, preparação das bibliotecas do gene 16S e sequenciamento

O DNA microbiano foi isolado a partir de amostras meconiais e fecais usando o QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) conforme as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi quantificada por espectrofotometria usando o espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare, Chicago, IL, Estados Unidos). Todas as amostras de DNA foram armazenadas a -80°C até a sua utilização. A região V4 do gene rRNA 16S foi amplificada e sequenciada utilizando o PGM Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) com os oligonucleotídeos iniciadores 515F e 806R⁽¹⁸⁾. Múltiplas amostras foram amplificadas por PCR usando iniciadores codificados em código de barras ligados à sequência do adaptador "A" (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') e a sequência do adaptador "P1" (5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3') para obter uma sequência iniciadora composta pelo adaptador A-barcode-806R e P1-515F. A reação de PCR foi feita em 25 μL e consistiu em 2U de Platinum® Taq DNA High Fidelity Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 4 μL 10X High Fidelity PCR Buffer, 2 mM MgSO_4 , 0.2 mM dNTP's, 0,1 μM de ambos os iniciadores descritos acima, 25 μg de UltraPure BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e, aproximadamente, 50 ng de DNA molde.

As condições de PCR utilizadas foram: 95°C durante 5 min, 35 ciclos de 94°C por 45s; 56°C por 45s e 72°C por 1 min.; seguidos por 10 min. de extensão final a 72°C . Os produtos de PCR resultantes foram purificados com o Reagente Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Brea, CA, Estados Unidos) e a concentração final do produto de PCR foi quantificada usando o kit Fluorômetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante.

Por fim, as reações foram combinadas em concentrações equimolares a fim de se criar uma mistura composta por fragmentos amplificados do gene 16S de cada amostra. Tal amostra composta foi utilizada para a preparação da biblioteca com o sistema Ion

OneTouch™ 2 usando o kit ION PGM™ Template OT2 400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). O sequenciamento foi realizado usando o kit comercial Ion PGM™ Sequencing 400 no Ion PGM™ System usando Ion 318™ Chip v2 com um máximo de 40 amostras por microchip.

Processamento dos sequenciamentos para análise

Os arquivos Fastq exportados do sistema ION PGM™ foram analisados com base nas recomendações do Projeto Microbioma Brasileiro⁽¹⁹⁾. Em síntese, uma tabela de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) foi elaborada utilizando-se o pipeline UPARSE⁽²⁰⁾, em que as sequências foram cortadas a 200 bases e filtradas por qualidade usando um erro máximo esperado de 0,5. As sequências foram reunidas em UTOs usando um critério de 97% de similaridade para o agrupamento, e sequências quiméricas foram removidas⁽²⁰⁾. A classificação taxonômica foi realizada utilizando o SINTAX⁽²¹⁾, contra o banco de dados do Projeto Ribosomal Database (RDP)⁽²²⁾, com um limiar de confiança de 80%. O esforço de amostragem foi estimado utilizando a cobertura de Good⁽²³⁾.

Análise estatística

A análise estatística dos dados clínicos foi realizada da seguinte forma: as variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartilica. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e relativas.

Para comparar médias, a Análise de Variância (ANOVA), em conjunto com o teste de Tukey, foi aplicada. Em caso de assimetria, o teste de Kruskal-Wallis, em conjunto com Dunn, foi utilizado. Na comparação de proporções, o teste qui-quadrado de Pearson, em conjunto com a análise dos resíduos ajustados, foi aplicado. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$) e as análises foram realizadas no programa SPSS versão 21.0.

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk W ($p > 0,05$). Variáveis quantitativas com distribuição normal foram descritas por médias/desvio padrão e comparadas pelo teste t de Student. As variáveis quantitativas com distribuição não normal foram descritas por meio da mediana/interquartil e comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis qualitativas foram descritas por frequências/percentis e comparadas com o Teste Exato de Fisher.

Todas as bibliotecas de genes 16S rRNA foram normalizadas por reamostragem aleatória das sequências para o mesmo número de sequências encontradas na menor biblioteca de acordo com as recomendações de Lemos *et al.*⁽²⁴⁾. O arquivo BIOM foi importado para o

ambiente R⁽²⁵⁾ e uma matriz de dissimilaridade composicional foi gerada com base em distâncias binomiais entre amostras usando o pacote "phyloseq"⁽²⁶⁾.

A matriz foi utilizada em uma análise de variância multivariada permutável não paramétrica⁽²⁷⁾ com a função *Adonis* disponível no pacote *vegan*⁽²⁸⁾ para detectar variáveis de confusão. Cálculos de dominância microbiana e índice de diversidade de Shannon foram obtidos e plotados usando o pacote "phyloseq"⁽²⁶⁾.

O pacote estatístico STAMP v2 foi usado para determinar diferenças na abundância relativa de gêneros microbianos entre tratamentos.⁽²⁹⁾ As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas utilizando o teste t não paramétrico de White e os intervalos de confiança foram calculados usando o método *bootstrap*. As unidades taxonômicas com uma diferença entre proporções abaixo de 1% foram excluídas da análise.

RESULTADOS

Os grupos foram compostos por: leite materno exclusivo (07 pacientes, com 25 amostras); fórmula láctea exclusiva (8 pacientes, com 31 amostras); prevalência de leite materno (16 pacientes, com 57 amostras); prevalência de fórmula láctea (16 pacientes, com 61 amostras); e, misto (fórmula láctea e leite materno), com 15 pacientes, e 53 amostras. Um total de 227 amostras de fezes de fraldas de 62 prematuros foi coletado semanalmente, começando com as primeiras fezes (mecônio), sendo uma amostra por semana, até a quarta semana de vida. Após a coleta, todas as amostras foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido até a extração do DNA. Os dados clínicos foram separados pela caracterização da amostra e o desfecho conforme as tabelas abaixo.

Na Tabela 1, temos a caracterização da amostra. Os cinco grupos foram separados e analisadas as variáveis por meio dos dados maternos e obstétricos. Somente houve diferença significativa na ocorrência de corioamniote.

Tabela 1 – Caracterização da amostra

| Variáveis | LME (n=7) | Fórmula láctea Exclusiva (n=8) | LM Predominante (n=16) | Predomínio de fórmula láctea (n=16) | Misto (n=15) | P |
|---|-----------------|---|------------------------------|--|-----------------|--------------|
| Idade materna (anos) – média ± DP | 24,0 ± 9,1 | 26,1 ± 6,4 | 31,6 ± 5,5 | 24,6 ± 7,4 | 28,0 ± 7,5 | 0,052 |
| Parto cesárea – n(%) | 7 (100) | 6 (75) | 13 (81,3) | 11 (68,8) | 12 (80) | 0,556 |
| Tempo de bolsa rota (h) – mediana (P25-P75) | 0 (0 - 3) | 0 (0 – 0,4) | 0,04 (0 – 37) | 6,1 (0 – 96,5) | 0 (0 – 3) | 0,246 |
| Tempo de bolsa rota ≥18h – n(%) | 0 (0,0) | 1 (12,5) | 4 (25) | 7 (43,8) | 2 (13,3) | 0,062 |
| ATB durante internação mãe – n(%) | 3 (42,9) | 5 (62,5) | 11 (68,8) | 14 (87,5) | 8 (53,3) | 0,188 |
| Pré-Eclâmpsia – n(%) | | | | | | 0,119 |
| Sim | 5 (71,4) | 1 (12,5) | 7 (43,8) | 6 (37,5) | 4 (26,7) | |
| Não | 2 (28,6) | 6 (75) | 9 (56,3) | 10 (62,5) | 11 (73,0) | |
| Eclâmpsia | 0 (0,0) | 1 (12,5) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | |
| Coriomionite – n(%) | 3 (42,9) | 6 (75)* | 3 (18,8) | 1 (6,3) | 7 (46,7) | 0,005 |
| Estreptococo – n(%) | 1 (14,3) | 2 (25) | 4 (25) | 5 (31,3) | 6 (40) | 0,944 |

* Associação estatisticamente significativa pelo teste dos resíduos ajustados a 5% de significância.

* Foram usados a média, o desvio padrão mediana e a amplitude interquartílica, sendo usada a Análise de Variância.

(ANOVA) em conjunto com o teste de Tukey foi aplicada. Em caso de assimetria, o teste de Kruskal-Wallis, em conjunto com Dunn, foi utilizado. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e relativas. Na comparação de proporções, utilizou-se o teste qui-quadrado de Pearson em conjunto com a análise dos resíduos ajustados foi aplicado.

Já na Tabela 2, temos os resultados dos desfechos entre os cinco grupos foram encontradas diferenças significativas nas variáveis peso de nascimento entre os grupos PLM, PFE E MISTO.

Tabela 2 – Desfechos conforme grupo em estudo

| Variáveis | LME (n=7) | Fórmula láctea Exclusiva (n=8) | LM Predominante (n=16) | Predomínio de fórmula láctea (n=16) | Misto (n=15) | p |
|--|-------------------------------|---|------------------------------|--|-----------------------------|-------|
| Peso ao nascer (PN) (g) – média ± DP | 912,1 ± 291,5 ^a | 1684 ± 430,1 ^b | 1460 ± 575,4 ^{ab} | 1459 ± 413,3 ^{ab} | 1332 ± 372 ^{ab} | 0,021 |
| Idade gestacional (IG) (semanas) – média ± DP | 27,7 ± 2,7 ^a | 30,6 ± 1,7 ^b | 29,9 ± 2,4 ^{ab} | 30,5 ± 1,6 ^b | 29,4 ± 1,7 ^{ab} | 0,031 |
| ECN – n(%) | 1 (14,3) | 0 (0,0) | 1 (6,3) | 1 (6,3) | 2 (13,3) | 0,778 |
| Uso de corticoide – n(%) | 6 (85,7) | 7 (87,5) | 16 (100) | 15 (93,8) | 15 (100) | 0,185 |
| Sepse precoce – n(%) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 1 (6,7) | 0,527 |
| Uso de antibiótico na 1 ^a semana – n(%) | 6 (85,7) | 3 (37,5) | 12 (75) | 13 (81,3) | 8 (53,3) | 0,110 |
| Sepse tardia – n(%) | 2 (28,6) | 3 (37,5) | 7 (43,8) | 5 (31,3) | 6 (40,0) | 0,937 |
| Uso de antibiótico na 2 ^a semana – n(%) | 7 (100) | 5 (62,5) | 10 (62,5) | 10 (62,5) | 41 (66,1) | 0,396 |
| Óbito – n(%) | 2 (28,6)* | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0,003 |

* associação estatisticamente significativa pelo teste dos resíduos ajustados a 5% de significância

* Para o PN e IG, foram usados a média e o desvio padrão. Comparamos as médias, por meio da Análise de Variância (ANOVA), em conjunto com o teste de Tukey. Em caso de assimetria, o teste de Kruskal-Wallis, em conjunto com Dunn, foi utilizado.

* As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e relativas. Na comparação, realizamos o teste qui-quadrado de Pearson, em conjunto com a análise dos resíduos ajustados.

Diferenças globais da comunidade microbiana entre dietas

As diferenças entre as comunidades microbianas no nível OTU (97% de similaridade) encontradas nas amostras fecais de recém-nascidos prematuros alimentados com cinco tipos de dietas diferentes, durante um período de 28 dias, são apresentadas na Figura 1.

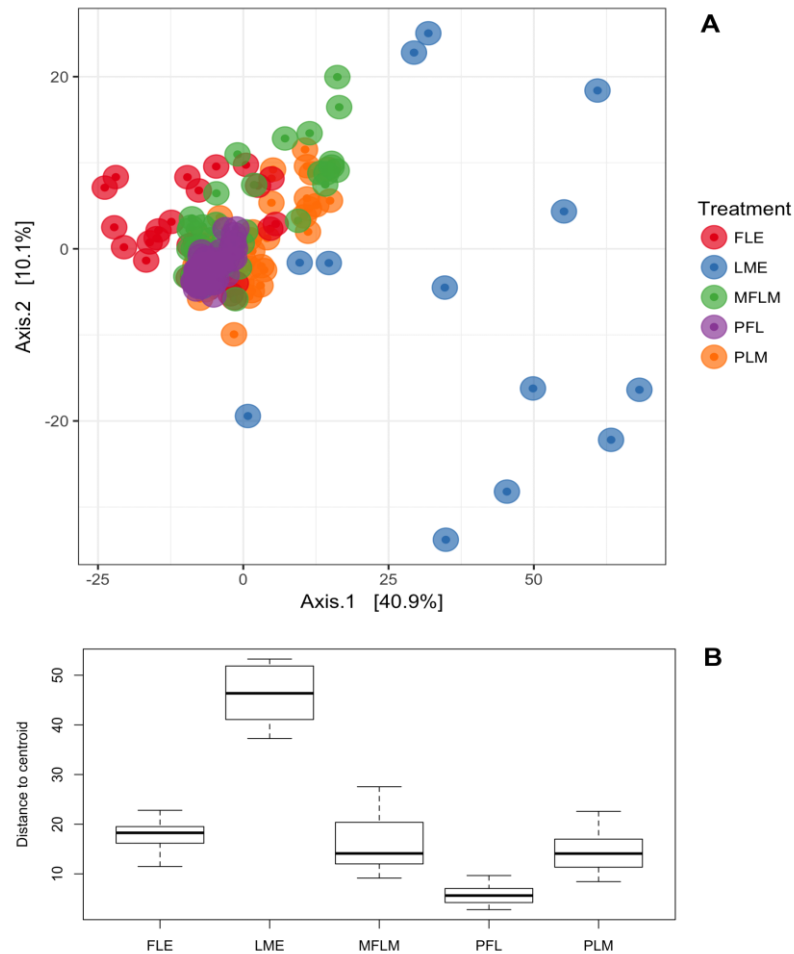


Figura 1 - Comparações da diversidade beta entre as comunidades microbianas encontradas em amostras fecais de alimentos para recém-nascidos prematuros com diferentes dietas durante 28 dias. A) Coordenadas principais (PCoA) que representam agrupamentos de comunidades microbianas. Cada ponto representa uma amostra individual, com cores indicando tratamentos de alimentação. B) Medição da dispersão multivariada para cada tratamento conforme calculado pela distância média dos membros do grupo ao centroide do grupo em espaço multivariante. FLE = alimentação por fórmula láctea apenas; LME = alimentação apenas pelo leite materno; MFLM = alimentação por fórmula láctea e leite materno; PFL = preferencialmente alimentado pela fórmula láctea; PLM = alimentação preferencial pelo leite materno.

A análise de ordenação revelou diferenças significativas na estrutura da comunidade microbiana entre os tratamentos, sugerindo que a alimentação usando diferentes dietas foi responsável pela montagem da comunidade que habitava o intestino dos prematuros. Essas diferenças foram confirmadas pela análise multivariada de variância permutativa (Tabela 3).

As análises globais indicam que, aproximadamente, 19% da variação nas distâncias entre os tratamentos foram explicadas pelas diferentes dietas fornecidas em cada um deles.

As comparações parciais revelaram que as dietas baseadas no leite materno reuniram comunidades microbianas com grande variação dentro do grupo (por exemplo, maiores diferenças entre as comunidades microbianas dos indivíduos alimentados com leite materno), enquanto as dietas baseadas em fórmula láctea criaram comunidades microbianas semelhantes (ver Figura 1B e Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância permutativa multivariada

| | F | R ² | P-valor ajustado |
|-----------------------------|-------|----------------|------------------|
| Todas as Amostras | | | |
| Dietas | 19.24 | 0.311 | 0.001 |
| Resíduos | | 0.688 | |
| Total | | 1.000 | |
| Comparação por pares | | | |
| PLM vs FLE | 14.17 | 0.168 | 0.01 |
| PLM vs LME | 21.89 | 0.274 | 0.01 |
| PLM vs MFLM | 7.28 | 0.080 | 0.01 |
| PLM vs PFL | 16.14 | 0.146 | 0.01 |
| FLE vs LME | 18.85 | 0.331 | 0.01 |
| FLE vs MFLM | 10.82 | 0.146 | 0.01 |
| FLE vs PFL | 12.92 | 0.148 | 0.01 |
| LME vs MFLM | 18.88 | 0.270 | 0.01 |
| LME vs PFL | 36.76 | 0.372 | 0.01 |
| MFLM vs PFL | 14.78 | 0.145 | 0.01 |

F = valor F por permutação. R² = mostra a porcentagem de variação explicada pelas dietas; Os valores de p foram baseados em 999 permutações e foram ajustados pela correção de Bonferroni.

FLE = alimentar apenas por fórmula; LME = alimentação apenas por leite materno; MFLM = alimentar pela fórmula e pelo leite materno; PFL = de preferência alimentado por fórmula; PLM = preferencialmente alimentado com leite materno.

Além disso, as maiores variações nas distâncias entre os tratamentos foram observadas nas comparações que envolvem apenas o uso de leite materno. Aproximadamente, 33% e 37% da variação na distância entre comunidades microbianas podem ser explicadas pelo tratamento com leite materno somente em comparação com a dieta com base exclusiva ou preferencialmente na fórmula láctea, respectivamente (Tabela 3).

As medidas de diversidade alfa indicaram diferenças significativas (p-valor <0,001 de acordo com o teste de Kruskal-Wallis) entre a diversidade de UTOs nos tratamentos (Figura 2).

A dieta composta apenas pelo leite materno (LME) permitiu uma maior diversidade microbiana (média de 85 UTOs). Por outro lado, a dieta preferencialmente baseada na fórmula láctea (PFL) apresentou a menor diversidade (média de 9 UTOs) (Figura 2). O número médio de UTOs encontrado nas outras dietas foi semelhante. As dietas baseadas apenas na fórmula láctea (FLE) e, preferencialmente, no leite materno (PLM), apresentaram uma média de 29 e 23 UTOs, respectivamente, e a dieta baseada em uma mistura de fórmula láctea e leite materno apresentou uma média de 25 UTOs.

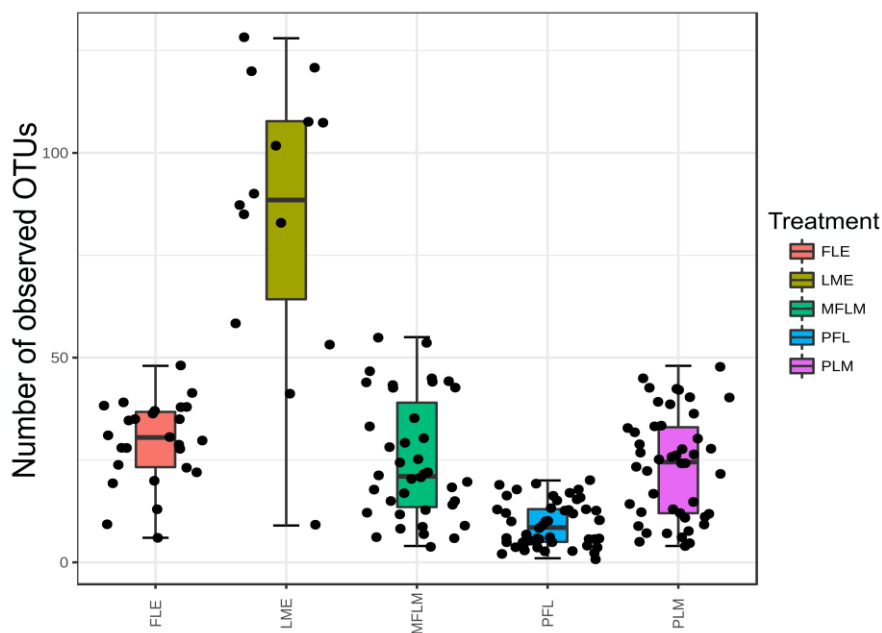


Figura 2 - Diversidade de comunidades microbianas (número de Unidades Taxonômicas Operacionais – OTUs) medidas em amostras fecais de alimentos para recém-nascidos prematuros com diferentes dietas durante 28 dias. As caixas abrangem o primeiro a terceiro quartil; a linha horizontal dentro das caixas representa a mediana. As que se estendem verticalmente das caixas indicam variabilidade fora dos quartis superiores e inferiores. O conjunto de dados foi rarefeito com o mesmo número de sequências antes das medidas de diversidade alfa. Os tratamentos foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (p-valor <0,001). FLE = alimentação por fórmula láctea apenas; LME = alimentação apenas pelo leite materno; MFLM = alimentação por fórmula láctea e leite materno; PFL = preferencialmente alimentado pela fórmula láctea; PLM = alimentação preferencial pelo leite materno.

Identificação das principais diferenças taxonômicas entre dietas

Uma vez que foram detectadas as diferenças globais entre as comunidades microbianas encontradas em amostras fecais de prematuros com dietas diferentes durante 28 dias, seguiu-se a identificação dos taxos microbianas responsáveis por essa diferença. Os filos mais abundantes detectados em todas as amostras foram *Bacteroides*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* (Figura 3), mas não foi detectada diferença entre os três filos entre os tratamentos, conforme medido pelo teste H de Kruskal-Wallis com uma probabilidade de erro de 0,05. O filo *Actinobacteria* também foi abundante entre os tratamentos, mas não foi encontrado em amostras fecais de recém-nascidos prematuros com uma dieta com base preferencialmente na fórmula láctea (p-valor <0,001).

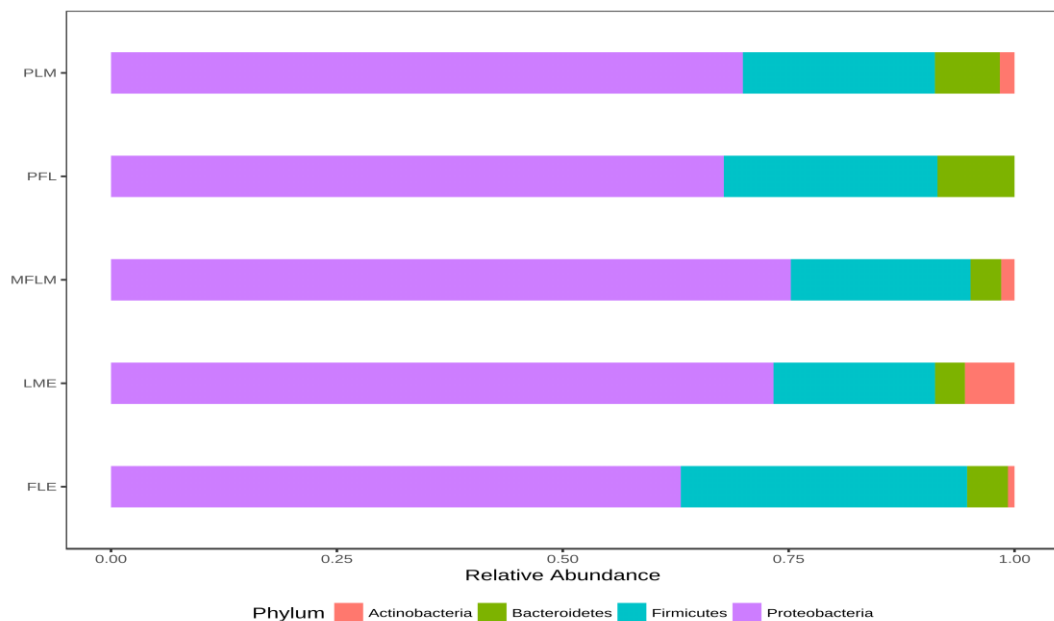


Figura 3 - Abundância relativa do phyla principal detectado nas amostras fecais de recém-nascidos prematuros com dietas diferentes durante 28 dias. FLE = alimentação por fórmula láctea apenas; LME = alimentação apenas pelo leite materno; MFLM = alimentação por fórmula láctea e leite materno; PFL = preferencialmente alimentado pela fórmula láctea; PLM = alimentação preferencial pelo leite materno.

Para detectar diferenças entre os tratamentos ao nível do gênero, foi realizada a análise de abundância diferencial aos pares baseada em um teste t de Welch bicaudal. Como o tratamento com LME apresentou a maior diferença na comunidade microbiana entre as dietas, as comparações aos pares foram realizadas entre LME e as outras dietas (Figura 4).

A proporção média do gênero *Escherichia* foi sempre maior nos tratamentos contendo fórmula láctea (FLE, PLM, MFLM e PFL) do que no tratamento com apenas leite materno (Figura 4). Particularmente, a dieta baseada no leite materno apresentou uma maior abundância de *Bradyrhizobium*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Faecalibacterium* e o gênero não identificado da família *Microbacteriaceae* em comparação com os outros tratamentos. Em comparação com a dieta baseada no leite materno, a dieta preferencialmente baseada no leite materno (PLM) e a dieta composta por uma mistura de fórmula láctea e leite materno aumentaram a abundância de *Clostridium* e *Escherichia*. As amostras fecais de recém-nascidos alimentados com uma dieta preferencialmente baseada em fórmula láctea (PFL) apresentaram maior abundância de *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterococcus* e o gênero não classificado da família *Enterobacteriaceae* quando comparado ao tratamento com LME (Figura 4).

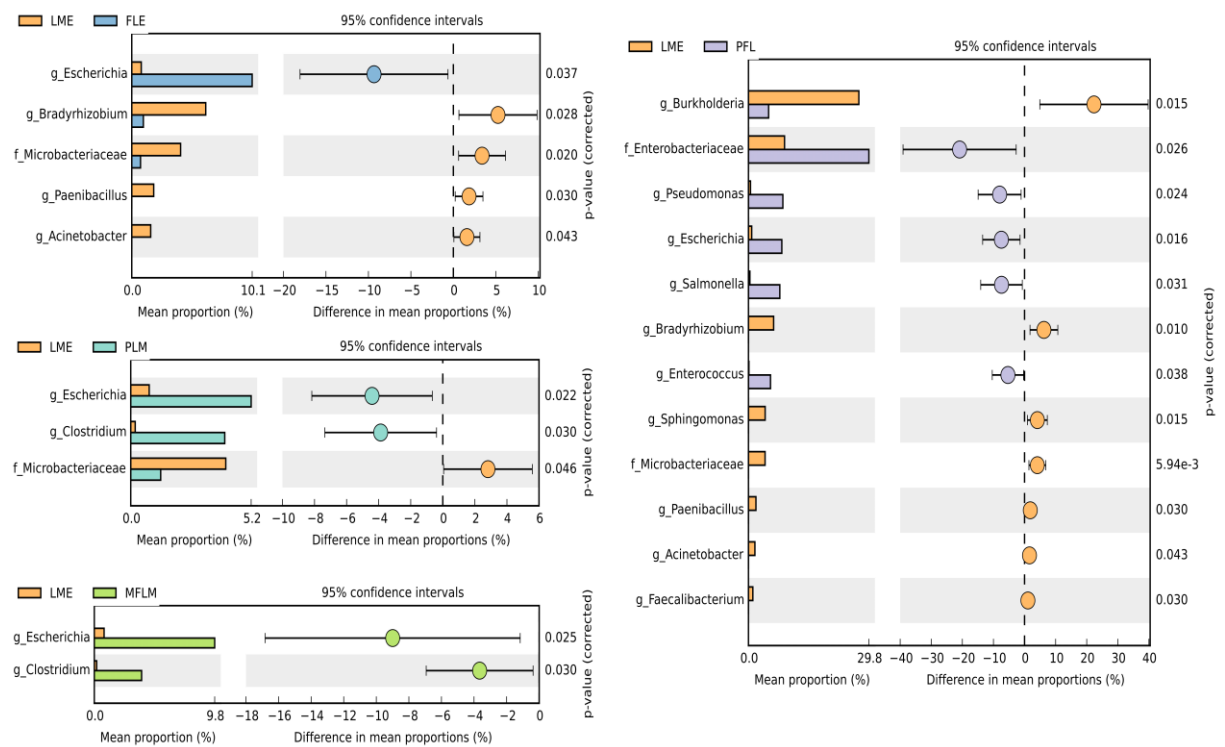


Figura 4 - Abundância microbiana diferencial entre as comunidades microbianas detectadas em amostras de recém-nascidos prematuros alimentados com diferentes dietas durante 28 dias. Os valores de P foram obtidos pelo teste t de Welch de dois lados seguido pela correção de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi combinado com filtro de tamanho de efeito (diferença entre tamanho de efeito de proporções $< 1,00$) foi aplicado para determinar os taxos mais importantes que diferem entre os tratamentos.

DISCUSSÃO

Os fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal estão sendo objeto de múltiplos estudos, para que, uma vez conhecidos e entendidos, novas estratégias possam ser desenvolvidas para a manutenção do estado de equilíbrio.^(16,17,30) Neste estudo, são encontradas diferenças globais da comunidade microbiana entre os tipos de dietas (LME,FLE,PLM,PFL,MLMF) administradas nos recém-nascidos prematuros, evidenciando que a maior diversidade se encontra nos que receberam leite materno exclusivo ou prevalente. Essas diferenças foram confirmadas pela análise de variância permutativa multivariada. Aproximadamente, 33% e 37% da variação na distância entre comunidades microbianas podem ser explicadas pelo tratamento com leite materno somente em comparação com dietas baseadas exclusivamente ou preferencialmente na fórmula láctea, respectivamente.

O conhecimento do número total de bactérias no leite permite o melhor entendimento do comportamento bacteriano em situações de proteção ou de infecções, por exemplo, o que facilitaria o desenvolvimento de mecanismos para a detecção de problemas existentes nos lactentes^(13,30), como já descreveram estudos realizados.^(8,17,30,31) No nosso estudo, as amostras fecais de prematuros alimentados com diferentes tipos de dietas foi decisivo na diversidade da comunidade microbiana durante o período de 28 dias. Todos os recém-nascidos eram prematuros e foram separados conforme o tipo de dieta alimentada, o que evidenciou que o leite materno apenas permitiu maior diversidade microbiana (média de 85 OTUs). O grupo baseado em fórmulas lácteas apresentou a menor diversidade (média de 9 OTUs). Essas dietas baseadas em fórmula láctea exclusiva e, de preferência, leite materno apresentaram uma média de 29 e 23 OTUs, respectivamente; e a dieta baseada em uma mistura de fórmula láctea e leite materno apresentou uma média de 25 OTUs. A proporção média do gênero *Escherichia* foi sempre maior em tratamentos contendo fórmula láctea do que no tratamento apenas com leite materno. Uma possível explicação para os resultados encontra-se na própria transmissão realizada da mãe para o filho e no ambiente externo após o nascimento, como já têm indicado estudos realizados^(31,32).

Apesar de vários estudos sobre o tema e a sua relação com doenças de alta complexidade^(1,3,4), eles restringiram-se apenas à sua enumeração baseada em cultura, perfilhamento genético (16S) e/ou utilização de amostras pequenas, o que deixa claro que os fatores que formam a microbiota intestinal não foram examinados a contento.^(1,5,6) Sabe-se que o desenvolvimento da microbiota dos recém-nascidos depende de fatores médicos e dietéticos^(1,7), mas não se sabe ainda como eles influenciam a sua composição geral e a sua

cooperação entre si.⁽¹⁾ Os estudos baseados em amostras fecais de lactentes e suas mães contribuem para o acompanhamento de cada estágio cronológico e funcional no decorrer do primeiro ano de vida.^(1,32)

Além de contribuir para o aumento da microbiota, o leite materno também favorece a prevenção da sepse, enterocolite necrosante (ECN) e outras doenças^(17,30,31,33). A ECN consiste em uma das principais causas de morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva neonatal, com a maioria dos casos ocorrendo entre prematuros^(30,33), por isso, em outro estudo nosso, ao invés de concentrar os esforços de pesquisa na descoberta de patógenos individuais relacionados ao desenvolvimento de ECN, se optou por compreender o equilíbrio de toda a comunidade microbiana, já que esta pode ser crucial para o desenvolvimento de uma microbiota intestinal saudável no recém-nascido, capaz de proteger da ECN; com isso, fornecemos provas de uma associação entre a ECN e as distorções no desenvolvimento normal da microbiota⁽³⁰⁾. Por isso, constatamos, a partir da microbiota fecal no período neonatal de recém-nascidos alimentados com leite materno exclusivo, que esta possui maior diversidade e uma composição de gênero diferente da alimentada com fórmula láctea, o que sugere que a microbiota fetal determinada pelo uso do leite materno próprio pode proteger contra diversas morbidades neonatais, como a ECN, por exemplo.

Outros estudos ressaltam a influência da dieta de acordo com as características étnicas e/ou geográficas como fatores que influenciam no desenvolvimento para a microbiota intestinal do recém-nascido^(34,35,36). No nosso estudo, tais questões não foram abordadas por não se tratarem do foco desse, deixando em aberto perspectivas para novos estudos.

O microbioma encontrado no leite materno (MBM) contribui, a curto e longo prazo, para a prevenção da colonização por agentes patogênicos, pois estimula a produção de anticorpos reativos e estabelece um microbioma intestinal saudável capaz de prevenir morbidades em longo prazo, como obesidade, diabetes tipo 2, inflamação intestinal crônica, distúrbios autoimunes, alergia, síndrome do intestino irritável e gastroenterite alérgica.^(17,37,38,39). Nosso estudo confirma que a microbiota intestinal dos recém-nascidos pré-termo apresenta diferenças de acordo com o tipo de alimentação recebida, se leite materno ou fórmula láctea e ressalta a importância do leite materno na diversidade da microbiota do recém-nascido.

Entretanto, algumas situações perpassaram a pesquisa, como a perda de amostras fecais; a dificuldade das mães em amamentar os prematuros com leite materno exclusivo devido a dificuldades socioeconômicas, por exemplo; e o baixo volume fecal produzido pelos prematuros.

O que se percebeu é que, apesar de vários estudos se dedicarem ao aleitamento materno e a sua influência na constituição da microbiota dos recém-nascidos, esse é um campo que ainda necessita de muita pesquisa, pois, cada vez mais, novas demandas surgem. Por isso, é importante que estudos nessa área continuem sendo realizados, pois esse se trata de um campo de larga abrangência, já que pode abranger desde a prematuridade até os primeiros anos de vida das crianças/dos bebês.

CONCLUSÃO

Diversos estudos têm se dedicado à temática do aleitamento materno, principalmente no tocante à microbiota dos recém-nascidos, a fim de identificar os seus benefícios para o desenvolvimento e a prevenção de doenças ao longo da vida desses. Diante da importância do tema, este estudo buscou descrever a microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termo de acordo com o padrão alimentar, com o intuito de estabelecer modificações dessa segundo o tipo da dieta enteral administrada, além de comparar o perfil da microbiota intestinal do recém-nascido pré-termo.

A partir dos dados levantados, nota-se que são encontradas diferenças globais da comunidade microbiana entre os tipos de dietas administradas nos recém-nascidos prematuros, evidenciando que a maior diversidade se encontra naqueles que receberam leite materno exclusivo ou prevalente. Isso nos leva a pensar que essa flora diversificada produz menores riscos à saúde e diminui o contágio de doenças, uma vez que já foram expostas em relação aos que receberam algum tipo de fórmula láctea e que se mantiveram com uma flora restrita.

Devido a isso, os fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal estão sendo objeto de múltiplos estudos, para que, uma vez conhecidos e entendidos, novas práticas possam ser desenvolvidas para a manutenção do estado de equilíbrio. Assim, o conhecimento da microbiota intestinal de acordo com o tipo de alimentação recebida pelo recém-nascido pré-termo poderá inaugurar futuras possibilidades terapêuticas direcionadas à flora intestinal conhecida.

REFERÊNCIAS

1. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, *et al.* Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015;17:690–703.
2. Cabreiro F, Gems D. Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Mol Med*. 2013; 5:1300-1310.
3. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486:207-214.
4. Li J, Jia H , Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, *et.al.* MetaHIT Consortium. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*. 2014;32:834-841.
5. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer, N, *et al.* R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:11971-11975.
6. Subramanian S, Huq S, Yatsunenkov T, Haque R, Mahfuz M, Alam M, *et al.* A persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*. 2014;510:417-421.
7. La Rosa PS, Warner BB, Zhou Y, Weinstock GM, Sodergren E, Hall-Moore, *et al.* Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:12522-12527.
8. Gregory KE, Samuel BS, Houghteling P, Shan G, Ausubel FM, Sadreyev RI, *et al.* Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. *Microbiome*. 2016; 4:68.
9. Houghteling P, Walker WA. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to the infant's and child's health? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015;60:294-307.
10. Zeissig S, Blumberg RS. Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nat Immunol*. 2014;15:307-10.
11. Brooks B, Firek BA, Miller CS, Sharon I, Thomas BC, Baker R, *et al.* Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. *Microbiome*. 2014;2:1.

12. Ardeshir A, Narayan NR, Méndez-Lagares G, Lu D, Rauch M, Huang Y, *et al.* Breast-fed and bottle-fed infant rhesus macaques develop distinct gutmicrobiotas and immune systems. *Sci Transl Med.* 2014;6:252ra120.
13. Boix-Amorós A, Collado MC, Mira A. Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Frontiers in Microbiology.* 2016;7:492.
14. Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martínez-Costa C. Impacto flactati on stage, gestation alage and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of Perinatology.* 2014;34:599-605.
15. Cabrera-Rubio R, Mira-Pascual L, Mira A, Collado MC. Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. *J Dev Orig Health Dis.* 2016;7:54-60.
16. Yasmin F, Tun HM, Konya TB, Guttman DS, Chari RS, Field C J, *et al.* Cesarean section, formula feeding, and infant antibiotic exposure: separate and combined impacts on gut microbial changes in later infancy. *Frontiers in Pediatrics.* 2017;5:200.
17. Cacho NT, Harrison NA, Parker LA, Padgett K A, Lemas DJ, Marcial GE, *et al.* Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own milk. *Frontiers in Microbiology.* 2017;8:1470.
18. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the illumina hiSeq and miSeq platforms. *ISME J.* 2012;6:1621–1624.
19. Pylro VS, Roesch LFW, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *Jornaul Microbiol Methods.* 2014;107:30–37.
20. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods.* 2013;10: 996–998.
21. Edgar R. SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. 2016. <https://doi.org/10.1101/074161>. Acesso em 27/01/2018.
22. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>.
23. Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika.* 1953;40:237–264.

24. Lemos LN, Fulthorpe RR, Triplett EW, Roesch LFW. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *J Microbiol Methods*. 2011;86:42–51.
25. R Development Core Team. R: *A language and environment for statistical computing*. 2008. Available at: <http://www.R-project.org>.
26. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*. 2013;8:e61217.
27. Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol*. 2001;26:32–46.
28. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O’Hara RB, *et al*. *Vegan: community ecology package*. 2015. R package vegan, version. 2.2–1.
29. Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 2014;30:3123–3124.
30. Dobbler PT, Procianoy RS, Mai V, Silveira RC, Corso AL, Rojas BS, *et al*. F. W. Low microbial diversity and abnormal microbial succession is associated with necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2243.
31. Gritz EC, Bhandari V. The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Front. Pediatr*. 2015;3:17.
32. Murphy K, Curley D, O’Callaghan TF, O’Shea C-A, Dempsey EM, O’Toole PW, *et al*. The Composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A Pilot Study. *Scientific Reports*. 2017;7:40597.
33. Pammi M, Cope J, Tarr PI, Warner BB, Morrow AL, Mai V, *et al*. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome*. 2017;5:31.
34. Stearns JC, Zulyniak MA, de Souza RJ, Campbell NC, Fontes M, Shaikh M, *et al*. Ethnic and diet-related differences in the healthy infant microbiome. *Genome Medicine*. 2017;9:32.
35. Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, *et al*. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology*. 2011;157:1385-92.
36. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, *et al*. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal Pediatric Gastroenterol Nutr*. 2010;51:77-84.

37. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutr Rev.* 2015;73:32-40.
38. Wallace JG, Gohir W, Sloboda DM. The impact of early life gut colonization on metabolic and obesogenic outcomes: what have animal models shown us? *J Dev Orig Health Dis.* 2016;7:15-24.
39. Lemas DJ, Yee S, Cacho N, Miller D, Cardel M, Gurka M, *et al.* Exploring the contribution of maternal antibiotics and breastfeeding to development of the infant microbiome and pediatric obesity. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2016;21:406-409.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos estudos têm se dedicado à questão do aleitamento materno, principalmente no tocante à microbiota dos recém-nascidos, a fim de identificar os seus benefícios para o desenvolvimento e a prevenção de doenças ao longo da vida desses. Diante da importância da temática, este estudo buscou descrever a microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termo de acordo com o padrão alimentar, a fim de estabelecer modificações dessa segundo o tipo da dieta enteral administrada, além de comparar o perfil da microbiota intestinal do recém-nascido pré-termo.

A partir dos dados levantados, percebe-se que são encontradas diferenças globais da comunidade microbiana entre os tipos de dietas administradas nos recém-nascidos prematuros, evidenciando que a maior diversidade se encontra nos que receberam leite materno exclusivo ou prevalente. Isso nos leva a pensar que essa flora diversificada causa menores riscos à saúde e redução do contágio de doenças, uma vez que já foram expostas em relação aos que receberam algum tipo de fórmula láctea e que se mantiveram com uma flora restrita. Por isso, os fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal estão sendo objeto de múltiplos estudos, para que, uma vez conhecidos e entendidos, novas estratégias possam ser desenvolvidas para a manutenção do estado de equilíbrio. O conhecimento da microbiota intestinal de acordo com o tipo de alimentação recebida pelo recém-nascido pré-termo poderá inaugurar futuras possibilidades terapêuticas direcionadas à flora intestinal conhecida.

APÊNDICE A - PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

N CÓDIGO RN _____ PRONT.: _____
 SEXO: (1) masc (2) feminino DN: ___ / ___ / ___ DATA ALTA: ___ / ___ / ___
 PRÉ-ECLAMPSIA (1) sim (2) não
 DADOS MATERNOS:
 Idade materna: ___ anos N° gestações: ___ Pré-termos anteriores: (1) sim (2) não
 N° consultas pré-natal: _____
 DMG/ DM: (1) sim (2) não (9) ignorado
 ITU/Inf. ovular: (1) sim (2) não (9) ignorado
 HAC: (1) s (2) n (9) ignorado BR: ___ horas (1) 18h (2) 18h (9) ignorado
 LA: (1) alterado (2) claro/normal (9) ignorado Cultura de estrepto B: (1) positiva (2) negativa (8) não fez
 Corticoide: (1) sim completo (2) não (3) sim incompleto (9) ignorado

DADOS DA INTERNAÇÃO HOSPITALAR:

Tempo de internação: ___ dias IGO: ___ sem Eco com ___ sem IG final: ___ sem
 PN: _____ g Comp: _____ cm PC: _____ cm IGP (Ballard, sem): ___ sem
 Classif. IG/P: (1) AIG (2) PIG Percentil <3: (1) não (2) sim TAX na
 admissão: _____
 Tipo de parto: (1) vaginal (2) cesariana (9) ignorado Indicação: _____
 Apgar 1': _____ Apgar 5': _____ SNAPPE II: _____
 Reanimação em sala de parto: (1) não precisou (2) O2 inalatório (3) VPP máscara
 (4) VPP TET (5) MCE (6) drogas (7) CPAP em SP (9) ignorado
 Surfactante sala de parto: (1) sim (2) não (9) ignorado Surfa outro momento: (1) sim (2) não (9) ignorado
 Horas de vida na primeira dose: _____ horas
 Surfa número total de doses: _____
 Surfactante: (1) profilático (2) terapêutico (3) profilático e terapêutico (8) não usou surfactante (9) ignorado

Sistema Respiratório:

DMH: (1) sim (2) não (9) ignorado Hipertensão pulmonar: (1) sim (2) não (9) ignorado
 BCP congênita: (1) sim (2) não (9) ignorado BCP adquirida: (1) sim (2) não (9) ignorado
 Pneumotórax: (1) sim (2) não (9) ignorado TTRN: (1) sim (2) não (9) ignorado
 VMAF: (1) sim (2) não (9) ignorado iNO: (1) sim (2) não (9) ignorado
 Hemorragia pulmonar: (1) sim (2) não (9) ign Adaptação Respiratória: (1) sim (2) não (9) ignorado
 Tempo VM: ___ dias VM não invasiva _____ dias TCPAPn: _____ dias
 Oxigenioterapia: ___ dias
 DBP: (1) sim (2) não Corticoide para displasia broncopulmonar: (1) sim (2) não
 Apneias: (1) trat. c/ xantinas (2) xantinas e doxapram (8) não teve apneias (9) ignorado
 Suspenso tratamento com: ___ dv (___ IG corrig) (9) ignorado

Suporte nutricional:

NPP AA nas 24h dv: (1) sim (2) não (9) ignorado Tempo de NPT: _____ dias
 Início da nutrição enteral: _____ dv (___/___/___) Enteral plena (150ml/kg/d): _____ dv
 (___/___/20___)
 Peso mínimo: _____ g Peso mínimo: _____ dv (___/___/200___)
 Recuper. PN: _____ dv (___/___/20___)
 NPT plena (3g/kg/dia de AA) com 5dv: (1)sim (2)não (8) não usou NPT(9) ignorado

Acessos vasculares:

Epicutâneo (PIC): (1) sim (2) não (9) ignorado Dissecção (flebo): (1) sim (2) não (9) ignorado
 Cateterismo (umbilical): (1) sim (2) não (9) ignorado

Infecções:

Sepse precoce: (1) sim - dx clínico (2) sim – HMC positiva Germe: _____ (8) não teve sepsse precoce
 Sepsse hospitalar: (1) sim – dx clínico (2) sim – HMC positiva Germe: _____ (8) não teve sepsse tardia
 Uso de antibióticos:

| Data: | Esquema: | Data: | Esquema: |
|---------------|----------|---------------|----------|
| ___/___/20___ | _____ | ___/___/20___ | _____ |
| ___/___/20___ | _____ | ___/___/20___ | _____ |
| ___/___/20___ | _____ | ___/___/20___ | _____ |
| ___/___/20___ | _____ | ___/___/20___ | _____ |
| ___/___/20___ | _____ | ___/___/20___ | _____ |

Meningite neonatal: (1) sim (2) não (9) ignorado Germe: _____
 ECN: (1) sim (2) não (9) ignorado Necessidade de intervenção cirúrgica: (1) sim (2) não

Sistema Nervoso:

Convulsões neonatais: (1) sim (2) não (9) ignorado
 HPIV: (0) não teve (1) grau I (2) grau II (3) grau III (4) grau IV (8) não fez eco cerebral
 LPV: (1) sim (2) não (8) não fez eco
 Ciclo sono-vigília: (1) ausente (2) imaturo (3) desenvolvido
 Sistema Cardiovascular:
 PCA: (1) dx ecocardio (2) dx clínico (8) não teve PCA (9) ignorado
 Indometacina: (1) profilática (2) tratamento (3) profilático e tratamento (8) não usou (9) ignorado
 Ibuprofeno: (1) profilática (2) tratamento (3) profilático e tratamento (8) não usou (9) ignorado
 Fez cirurgia para PCA: (1) sim (2) não
 Drogas vasoativas nas primeiras 72 horas: (1) sim (2) não
 Quais: _____
 Uso de CTC para choque: (1) sim (2) não
 Outros:
 Osteopenia (nível + alto de FA): _____ Tratamento: (1) sim (2) não (3) não teve (9) ignorado

Transfusão de CHAD: _____ (número de transfusões) Data da última transfusão:
 ___/___/200__

Hipoglicemia: (1) sim (2) não (9) ignorado EIM: (1) sim (2) não (9) ignorado

Incompatibilidade ABO: (1) sim (2) não (9) ignorado Exsanguíneo transfusão: (1) sim (2) não (9) ignorado

Uso de imunoglobulina para incompatibilidade ABO: (1) sim (2) não (9) ignorado

DADOS DA ALTA HOSPITALAR:

ROP: (0) sem ROP (1) ROP 1 (2) ROP 2 (3) ROP 3 (4) ROP 4 (5) ROP 5 (8) não fez avaliação

Fez cirurgia para ROP: (1) sim (2) não (9) ignorado

OEA: (1) alterado unilateral (2) alterado bilateral (3) normal (8) não fez OEA

Exame neurológico: (1) alterado (2) normal (8) não realizado (9) ignorado

Alta hospitalar com oxigênio: (1) sim (2) não

Peso: _____ g Comp: _____ cm PC: _____ cm PT: _____ cm PB: _____ cm

Alimentação: (1) SM exclusivo (2) Aleitamento misto (3) Fórmula láctea exclusiva

Teste do pezinho: (1) normal (2) alterado (8) não foi feito (9) ignorado

Momento da coleta de fezes:

Primeiro mecônio _____ horas de vida

FEZES II _____ horas de vida (1ª semana)

FEZES III _____ horas de vida (2ª semana)

FEZES IV _____ horas de vida (3ª semana)

FEZES V _____ horas de vida (4ª semana)

FEZES VI _____ horas de vida (5ª semana)

Exemplo: Controle Diário (até o final da internação)

| Dia Int. | Data | Peso | Quantidade de FL (mL/Kg/dia) | Quantidade de LM (mL/Kg/dia) | Quantidade SM/dia | NPT Solução (mL/Kg/dia) | NPT Lipídios (mL/Kg/dia) |
|----------|------|------|------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| 01 | | | | | | | |
| 02 | | | | | | | |

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando seu filho ou tutelado a participar do projeto de pesquisa: **Influência da nutrição enteral na microbiota intestinal do recém-nascido pré-termo.**

O presente estudo busca avaliar bactérias (germes) que habitam o intestino de recém-nascidos prematuros e saber se existe associação com o tipo de leite recebido durante a internação na UTI Neonatal (leite da mãe ou fórmula lácteas).

Para isso, é necessário retirar as primeiras fezes das fraldas dos recém-nascidos para exames, e ainda, outras amostras serão coletadas 1 x semana durante o tempo de internação do recém-nascido. **Nenhuma intervenção aplicada diretamente ao recém-nascido ocorrerá com a finalidade do desenvolvimento dessa pesquisa.**

A participação no estudo também não trará benefícios para seu filho ou tutelado, porém, pode ajudar para o aumento do conhecimento sobre influência da nutrição enteral na composição de bactérias (germes) que habitam o intestino do recém-nascido pré-termo.

A participação no estudo é totalmente voluntária, e você possui liberdade para retirar seu filho ou tutelado do estudo se acreditar necessário. Caso não concorde em participar do estudo, não haverá prejuízo à assistência do recém-nascido.

Informamos também que a participação no estudo não prevê custos para os participantes, bem como não prevê qualquer tipo de remuneração.

Os pesquisadores se comprometem em manter os dados em sigilo, e os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participam do estudo.

Você poderá esclarecer qualquer dúvida durante o período de realização da pesquisa, através do contato com o pesquisador responsável Dra. Rita de Cássia Silveira, no serviço de neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do telefone 33591-8794. **O Comitê de Ética em Pesquisa poderá ser contatado para esclarecimento de dúvidas, no segundo andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone: 3359-7640, das 8h às 17h, de segunda a sexta.**

Este Termo De Consentimento Livre E Esclarecido é elaborado em duas vias, sendo uma destinada ao participante e outra fica em posse do grupo de pesquisa.

Nome do Participante _____

Pesquisador _____ Assinatura _____

Responsável _____ Assinatura _____

Local e data _____