

nº 93

TEMAS DE PEDIATRIA

**Microbiota:
a visão de diferentes
especialistas**



Nestlé
NutritionInstitute

TEMAS DE PEDIATRIA

NÚMERO 93

Microbiota: a visão de diferentes especialistas

Profa. Dra. Christiane Araujo Chaves Leite

Professora Adjunta de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará; Mestre e Doutora em Pediatria pela Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; Título de Especialista em Gastroenterologia Pediátrica pela Sociedade Brasileira de Pediatria; Título de Especialista em Terapia Nutricional Pediátrica pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral.

Profa. Dra. Cléa Rodrigues Leone

Professora Livre Docente em Pediatria Neonatal pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP; Professora Associada do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP; Diretora de Publicações da Sociedade de Pediatria de São Paulo; Consultora Científica do Hospital e Maternidade Santa Joana

Profa. Dra. Cristina Miuki Abe Jacob

Professora Associada do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; Chefe da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Prof Dr Mauro Sergio Toporovski

Professor responsável pela disciplina de Gastroenterologia Pediátrica da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; Professor Assistente do Departamento de Pediatria da FCM da Santa Casa de São Paulo; Diretor de cursos da Associação Paulista Pediátrica de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição.

Nestlé
NutritionInstitute

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Christiane Araujo Chaves Leite

E-mail: christiane.leite@gmail.com

Profa. Dra. Cléa Rodrigues Leone

E-mail: clearleone@uol.com.br

Profa. Dra. Cristina Miuki Abe Jacob

E-mail: miuki55@uol.com.br

Prof Dr Mauro Sergio Toporovski

E-mail: toporovski@uol.com.br

O presente trabalho reflete exclusivamente o ponto de vista dos autores.

“É proibida a reprodução total ou parcial, por qualquer meio ou processo.”

SUMÁRIO

A microbiota intestinal e suas inter-relações nutricionais	5
Profa. Dra. Christiane Araujo Chaves Leite	

Introdução	5
Colonização bacteriana intestinal e desenvolvimento do sistema de defesa da mucosa do intestino	5
Influência da alimentação na microflora intestinal	9
Resumindo as interações intestino-microbiota ¹⁰	11
Funções metabólicas da microbiota intestinal	11
Indução de inflamação subclínica	12
A microbiota intestinal afeta a programação metabólica?	13
Conclusões e perspectivas futuras	14
Referências bibliográficas	14

Desenvolvimento da microbiota intestinal. Fatores perinatais ...	17
Profa. Dra. Cléa Rodrigues Leone	

I. Características da MI ao nascimento	17
II. Funções da MI no recém-nascido	20
III. Fatores maternos e perinatais	21
III.I. Tipo de parto	22
III.II. Tipo de alimentação	22
III.III. Uso de antibióticos	23
III.IV. Desvios do crescimento intrauterino	24
IV. Considerações finais	24
V. Referências bibliográficas	25

**A interação entre a microbiota e o sistema imune
de mucosa do trato gastrointestinal 26**
Prof. Dra. Cristina Miuki Abe Jacob

Interação entre microbiota e sistema imune do trato
gastrointestinal 28

Referências bibliográficas 32

A microbiota intestinal e as afecções do trato digestório 34
Prof Dr Mauro Sergio Toporovski

Trato digestório e microbiota intestinal 35

Flora bacteriana na doença 36

Flora bacteriana e alergia 37

Flora bacteriana e antibióticos 37

Supercrescimento bacteriano 38

Sprue tropical 38

Probióticos 38

Probióticos e promoção da saúde 40

Prebióticos 42

Simbióticos 44

Conclusões 44

Referências bibliográficas 45

A MICROBIOTA INTESTINAL E SUAS INTER-RELAÇÕES NUTRICIONAIS

*Profa. Dra. Christiane Araujo
Chaves Leite*

INTRODUÇÃO

Normalmente, todos os constituintes do organismo dos mamíferos que se comunicam com o ambiente abrigam um grande número de microrganismos. A flora do trato gastrointestinal é a parte mais complexa desta flora normal dos mamíferos. Ao longo dos anos foram feitas várias tentativas de isolar, identificar e caracterizar de forma completa o grande número de cepas de micróbios que formam este ecossistema. No entanto, sabe-se que a completa avaliação qualitativa e quantitativa da flora gastrointestinal do ser humano é um processo extremamente demorado e difícil de ser realizado¹.

O intestino humano contém um número imenso de microrganismos, chamados coletivamente de microbiota. Essa comunidade é dominada por bactérias anaeróbicas e inclui cerca de 500 a 1.000 espécies. Estima-se que seus genomas contenham cerca de 100 vezes mais genes do que o próprio genoma humano^{2,3}. Nossa microbiota intestinal pode ser descrita como um órgão microbiano que contribui para nossa homeostase; suas funções são múltiplas e amplamente variáveis⁴.

A flora intestinal tem um importante papel no funcionamento normal do intestino e na manutenção da saúde do hospedeiro. Os benefícios das bactérias comensais são bem conhecidos: contribuem na digestão da celulose, economizam energia e formam uma barreira de defesa natural que é considerada essencial no desenvolvimento e na maturação da imunidade sistêmica e de mucosa⁵.

A microbiota intestinal é composta de bactérias potencialmente patogênicas ladeadas por microrganismos não patogênicos e promotores da saúde. Acredita-se que o tamanho da população de cada espécie seja rigorosamente controlado pela competição por nutrientes e espaço⁵. Assim, os agentes patogênicos potenciais, como a *E. coli* e outras enterobactérias, são mantidos em número moderado, e é difícil que se estabeleçam novas bactérias recém-chegadas. Esta função da microflora normal é denominada “resistência à colonização”⁶.

COLONIZAÇÃO BACTERIANA INTESTINAL E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE DEFESA DA MUCOSA DO INTESTINO

À semelhança do feto, o lactente ao nascimento tem o trato gastrointestinal estéril, mas a colonização bacteriana ocorre rapidamente^{7,8}. A microflora intestinal materna é a fonte natural das bactérias que colonizam o recém-nascido⁹. A idade gestacional, o tipo de parto

e a dieta exercem efeitos significantes nesse processo. Os recém-nascidos de cesariana, prematuros e/ou expostos ao uso perinatal ou pós-natal de antibióticos apresentam um atraso na colonização bacteriana probiótica comensal¹⁰. As práticas obstétricas modernas diminuem de modo considerável a transferência de bactérias da mãe ao recém-nascido durante o parto; durante a cesárea esta transferência está praticamente ausente, o que causa um atraso no estabelecimento das bactérias no intestino, especialmente as anaeróbias. Em compensação, nessas circunstâncias as bactérias são adquiridas predominantemente a partir do meio ambiente. Na maternidade e nas unidades de atenção neonatais, as enterobactérias passam de um recém-nascido para outro, o que provavelmente também ocorre com os germes anaeróbios⁶.

Quando nascidos de parto vaginal, lactentes amamentados e também aqueles que não recebem leite materno apresentam padrão semelhante de colonização bacteriana aos 2 dias de vida. No entanto, por volta do sétimo dia de vida, aproximadamente dois terços dos lactentes não amamentados apresentam uma predominância de *Bacteroides fragilis* em comparação com apenas 22% dos lactentes amamentados ao seio⁷.

A implantação das diferentes cepas bacterianas ocorre de uma forma regulada pelo meio intestinal, que por sua vez se altera à medida que sucessivamente se estabelecem novos grupos bacterianos. Assim, por exemplo, o potencial de óxido-redução positivo (alto teor de

oxigênio) do intestino do recém-nascido promove a expansão das bactérias aeróbias ou dos anaeróbios facultativos, como a *E. coli* e outras enterobactérias, enterococos e estafilococos, pois as bactérias anaeróbias obrigatórias não podem se desenvolver inicialmente. À medida que as bactérias aeróbias e as anaeróbias facultativas consomem o oxigênio, o meio torna-se mais adequado às bactérias anaeróbias, como bifidobactérias, *Bacteroides* e *Clostridia*, que começam a proliferar. Quando os anaeróbios se expandem, as bactérias facultativas diminuem, possivelmente pela diminuição dos nutrientes passíveis de ser utilizados em um meio sem oxigênio. Contudo, durante os primeiros meses ou anos de vida, pode persistir a presença em número relativamente elevado de bactérias facultativas⁶.

Ao final do primeiro mês de vida, nos países em desenvolvimento, os lactentes amamentados demonstram uma colonização bifidobactéria-predominante, enquanto os lactentes não amamentados apresentam colonização com espécies *Bacteroides* e bifidobactérias. Em países ricos, entretanto, as diferenças são menos pronunciadas entre os lactentes amamentados e os não amamentados¹¹. Nos países em via de desenvolvimento é provável que os lactentes estejam expostos a numerosas bactérias desde o nascimento⁹. Sendo assim, ocorre a aquisição precoce de anaeróbios facultativos, bem como de aeróbios. Todavia, nestas condições, a flora adquirida de forma precoce é instável e compreende

uma grande variedade de agentes potencialmente patogênicos que podem se disseminar e causar infecções extraintestinais. A utilização de antibióticos no tratamento das infecções neonatais altera profundamente o equilíbrio microbiano do intestino e torna o lactente suscetível a novos episódios infecciosos. Nos países mais industrializados, o problema pode ser o oposto. A rigorosa higiene existente no cuidado neonatal moderno pode retardar o estabelecimento de uma microflora funcionalmente ativa e que possua capacidade protetora⁶.

A composição da microflora intestinal não se altera significativamente após a fase de lactente. Portanto, a composição da flora fecal em crianças de maior idade e em adultos é menos variável e não é tão dependente da dieta. De fato, posteriormente à fase de lactente, as concentrações bacterianas no cólon são tipicamente de 1.012 unidades for-

madoras de colônia por mL de conteúdo intestinal (10 vezes o número total de células humanas no corpo humano) e com bactérias anaeróbias superiores aos coliformes aeróbicos¹².

No entanto, levando-se em conta algumas patologias e sua potencial relação com a microflora, é razoável dizer que a microbiota intestinal humana é dinâmica e responsiva a mudanças dietéticas (Tabela 1), as quais podem imprimir efeitos profundos em sua composição¹³⁻¹⁵. Não obstante, vários estudos demonstraram que a microbiota de um indivíduo é mais constante ao longo do tempo, diferindo entre indivíduos. A microbiota inicial é caracterizada por baixa diversidade e representada principalmente pelos anaeróbios facultativos pertencentes a *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. A microbiota intestinal torna-se então mais diversa e constituída por *Firmicutes* e *Bacteroidetes* predominantemente¹⁶⁻¹⁸.

Tabela 1 - Composição da microbiota do intestino humano

Estágio	Características
Feto	Estéril
Ao nascimento	Colonizado por bactérias do ambiente; microbiota materna: vaginal e fecal
Neonato	Inicialmente diversidade baixa, bactérias anaeróbias facultativas (<i>Proteobactéria/Actinobactéria</i>); progredindo para maior diversidade e dominada por <i>Firmicutes</i> e <i>Bacteroidetes</i>
Adulto	Diversa, com microbiota semelhante no mesmo indivíduo ao longo do tempo, mais do que entre indivíduos; mecanismos de seleção podem estar envolvidos; seleção positiva: fatores do hospedeiro, em geral, glicolípides no epitélio, glicanos específicos no muco do hospedeiro; seleção negativa: dieta e sistema imune
Adulto com Doença Inflamatória Intestinal ou Diabetes tipo 2	Diversidade microbiana reduzida, particularmente <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Adulto com Obesidade	Diversidade bacteriana reduzida, particularmente <i>Bacteroidetes</i>

O desenvolvimento da microbiota do adulto deverá ser o resultado de seleções positivas e negativas. Alguns desses mecanismos de seleção positiva poderiam ser fatores do hospedeiro que permitem a aderência de bactérias específicas, por exemplo glicolípides ou glicanos específicos no muco do hospedeiro. De forma semelhante, a dieta é o fator mais preponderante na definição da microbiota intestinal. Em contraste, o sistema imune do hospedeiro pode alterar a comunidade microbiana, “aniquilando” grupos específicos de bactérias. Além disso, moléculas efetoras expressas no epitélio podem também afetar a composição microbiana intestinal e agir de forma protetora em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal (DII). Curiosamente, vários estudos vêm demonstrando que a microbiota intestinal de pacientes com DII apresenta pequena diversidade, e modelos animais têm comprovado evidência direta de que a microbiota intestinal pode estar envolvida no desenvolvimento de DII¹⁹⁻²¹. O sistema de defesa da mucosa intestinal é parte integrante de uma rede sofisticada imunorreguladora que inclui a microflora intestinal²²⁻²⁶. O reconhecimento de autoantígenos e não autoantígenos começa no início da vida, talvez já no útero, e é significativamente influenciado por eventos que ocorrem dentro do sistema digestivo, logo após o nascimento. A resposta imunitária do sistema digestivo é especialmente afetada pela dieta da criança pequena, o estado de colonização bacteriana e a

exposição precoce a potenciais agentes infecciosos e antibióticos, bem como o genótipo do bebê²⁷. As infecções extraintestinais dos recém-nascidos, por exemplo, as do trato urinário e as septicemias são causadas frequentemente por *E. coli* e outras enterobactérias. Antes do firme estabelecimento da microflora anaeróbia e especialmente durante as primeiras semanas de vida, estas bactérias potencialmente patogênicas podem alcançar níveis populacionais muito elevados no intestino, o que pode promover sua propagação a localizações extraintestinais. Devido à limitada presença da flora anaeróbia, as bactérias enteropatogênicas também podem estabelecer-se facilmente no intestino durante este período⁶.

Supõe-se que a ocorrência de muitas doenças, tanto intestinais quanto não intestinais, possa estar relacionada a uma desregulação ou interferência no desenvolvimento precoce do sistema de defesa da mucosa intestinal^{25,26}. Exemplos destas doenças incluem aquelas chamadas atópicas (asma, eczema e rinite alérgica) ou autoimunes (esclerose múltipla, *diabetes mellitus* tipo 1 e doença inflamatória crônica do intestino)²⁵. Possivelmente, o principal fator determinante no desenvolvimento do sistema imunológico é a própria predisposição genética²².

A base molecular da imunidade inata e adquirida provavelmente reside no reconhecimento e na resposta de linfócitos T maduros a moléculas de gatilho, tais como aquelas derivadas de

produtos alimentares e de desagregação bacteriana dentro do trato intestinal. As moléculas de disparo também incluem nucleotídeos dietéticos e oligossacarídeos. Receptores *Toll-like* localizados na membrana de superfície de linfócitos T facilitam o reconhecimento destas moléculas de gatilho, que conduzem eventualmente para o reconhecimento de linfócitos T especializados e a resposta à exposição subsequente para as mesmas moléculas ou muito semelhantes. Dessa forma, os linfócitos T específicos para reconhecimento de oligossacarídeos ligados a agentes patogênicos intestinais desempenham um papel importante na prevenção de doenças gastrointestinais²⁶.

INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO NA MICROFLORA INTESTINAL

Apesar da numerosa quantidade de bactérias que compõem a microflora intestinal e seu potencial patogênico, os seres humanos não desenvolvem infecções, demonstrando assim a eficácia dos mecanismos imunes relacionados ao intestino. O tecido imunológico associado ao intestino (GALT) constitui aproximadamente 80% das células imunologicamente ativas nos seres humanos²⁸. A flora microbiana é responsável pela abundância e ativação do sistema imune de mucosa em indivíduos saudáveis²⁹. Por exemplo, a ausência de microflora (como em animais criados livres de germes, ou *germ-free*) leva a uma mu-

cosa atrófica e a uma resposta imune celular subdesenvolvida, bem como à maturação inadequada da produção de anticorpos, particularmente imunoglobulina A (IgA)²⁹⁻³². Assim, a microflora intestinal influencia profundamente o desenvolvimento da resposta imune de mucosa do intestino: celular (específica e não específica) e humoral³³.

Em resumo, o intestino necessita de exposição a bactérias para desenvolver sua defesa imunológica e as respostas imunes adequadas (não exageradas), que alicerçam a saúde do hospedeiro. Os mecanismos de interação hospedeiro-microbiota vêm sendo desvendados e, em grande parte, explicam os efeitos clínicos que determinados microrganismos vivos ingeridos (probióticos) têm na melhoria da saúde do hospedeiro, incluindo-se o aprimoramento dos mecanismos de defesa (como contra infecções virais), bem como a modulação da resposta imune do indivíduo (tal como na doença alérgica)¹⁰.

Na maioria dos bebês amamentados, as contagens de bifidobactérias aumentam rapidamente e constituem de 80% a 90% da flora total. Lactobacilos e *Bacteroides* aumentam em menor proporção, e há pequena quantidade de enterobactérias. As crianças não amamentadas, por outro lado, tendem a ter uma flora mais complexa, composta principalmente de *Coliformes* e *Bacteroides*, com prevalência significativamente menor de bifidobactérias^{7,34}. Após o desmame, a microflora dessas crianças começa a assemelhar-se à dos

adultos, com incremento de *Bacteroides*, *Veillonella* e *Fusobacterium*. Ao mesmo tempo, o número de microrganismos não cultiváveis também aumenta. Embora a composição da microflora varie entre indivíduos, a composição dentro de cada indivíduo permanece estável por longo período^{7,35}.

Análises do intestino de ratos *germ-free* revelam um sistema imunológico de mucosa subdesenvolvido e escasso, com placas de Peyer pequenas, sem centros germinativos, e pequenas zonas de células T. A lâmina própria praticamente não contém plasmócitos, IgA ou células T CD4, e os linfócitos intraepiteliais também são raros²⁹⁻³². Nos seres humanos, a evidência da dependência do sistema imune de mucosa da microbiota é respaldada pelos poucos estudos de análise do intestino de recém-nascidos que demonstram características semelhantes às encontradas nos ratos *germ-free*. Assim, a microflora intestinal é responsável pelo desenvolvimento do sistema imune de mucosa em crianças saudáveis. Existem agora evidências abundantes de que a sinalização através de receptores específicos, particularmente receptores *Toll-like*, permite às bactérias intestinais afetar a função de células epiteliais, determinando a diferenciação de células T e as respostas de anticorpos aos antígenos de células T dependentes e regulando assim a resposta imune intestinal. A colonização é, então, aparentemente responsável pela resposta de IgA aos antígenos luminais. A IgA secretória está

entre os componentes mais importantes da resposta de anticorpos às proteínas luminais e aos antígenos dos patógenos. A colonização também induz à modulação da razão de *T-helper* tipo 2 (Th2, pró-alérgica)/*T-helper* tipo 1 (Th1, supressora), podendo diminuir as chances de hiper-reatividade imunológica, como ocorre nas doenças alérgicas³⁶. As interações entre o hospedeiro e a microbiota e seus efeitos sobre a resposta imune proporcionam uma explicação racional para o uso de bactérias probióticas em populações pediátricas. Os probióticos, quando administrados por via oral, exercem efeitos sobre a flora intestinal específica, bifidobactérias e lactobacilos, colonizando transitoriamente o intestino de lactentes e crianças de mais baixa idade. Aumentos significativos de bifidobactérias nas fezes têm sido relatados precocemente (em torno de uma semana) após a suplementação. Em alguns casos, estas contagens podem atingir níveis semelhantes àqueles encontrados em lactentes amamentados³⁷⁻³⁹. Adicionalmente, foi demonstrado que a suplementação com bifidobactérias em lactentes prematuros teve um impacto positivo na modificação da microflora intestinal^{40,41}. Os efeitos benéficos referem-se ao aumento de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes e à redução do pH fecal e da amônia fecal, assim como à diminuição da concentração de *Bacteroides* e *E. coli*^{38,39}. Probióticos específicos afetam positivamente a razão microflora favorável/desfavorável

em lactentes e crianças, levando a mudanças positivas no ambiente luminal do intestino. É importante ressaltar que, quando as bactérias probióticas (bifidobactérias e lactobacilos) são ingeridas, não fazem parte da microflora residente do hospedeiro de modo permanente, e sua contagem normalmente diminui, ou desaparece, uma vez interrompida sua ingestão.

RESUMINDO AS INTERAÇÕES INTESTINO-MICROBIOTA¹⁰

1. A aquisição e o estabelecimento da microflora intestinal são necessários para o desenvolvimento adequado da função de barreira do intestino e da resposta imune do hospedeiro.
2. Certos tipos de bactérias residentes, ou seja, lactobacilos e bifidobactérias, não são tipicamente patogênicos e parecem benéficos na promoção do desenvolvimento e da resposta do sistema imune do hospedeiro.
3. A composição da microflora intestinal de bebês não amamentados ao seio ou de bebês e de crianças que desenvolvem doença diarreica, doença atópica e outras condições inflamatórias parece alterada quando comparada com a microflora de lactentes sob amamentação ou de lactentes e crianças saudáveis. Particularmente, estes lactentes apresentam contagens menores de bifidobactérias e lactobacilos em relação a outros componentes da microflora.

4. Lactobacilos e bifidobactérias específicos, quando ingeridos, podem modificar a composição da ecologia microbiana intestinal.
5. Estes organismos ingeridos agem potencialmente como um apoio à função de barreira intestinal do hospedeiro e ao apropriado desenvolvimento e resposta do sistema imune. Estas interações são a base do conceito que respalda o uso de bactérias probióticas em lactentes e crianças.

FUNÇÕES METABÓLICAS DA MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal é o resultado da interface entre a dieta e o genoma do hospedeiro e tem implicações importantes no processamento dos alimentos e na disponibilidade de nutrientes para o hospedeiro (Figura 1).

Figura 1 - As relações entre o genoma humano, o ambiente (dieta, por exemplo, como aqui demonstrado) e a microbiota intestinal afetam nosso metabolismo.



Figuras publicadas no suplemento do *Annals of Nutrition and Metabolism* 2011, 58(suppl2) 44-52 e reproduzidas sob permissão

Além do mais, a microbiota intestinal é um importante “desintoxicante” de compostos xenobióticos que ingerimos e que podem também afetar o metabolismo de drogas⁴².

A despeito da ingestão aumentada de alimentos, os ratos *germ-free* têm capacidade reduzida de extrair energia da dieta⁴³. O estado *germ-free* está associado com reduzido estoque de energia no fígado e musculoesquelético^{44,45}. Esses achados sugerem que o estado *germ-free* se assemelha ao de restrição calórica, o qual está associado com a longevidade. De fato, os ratos *germ-free* parecem ter uma expectativa de vida aumentada e aparentam ser mais saudáveis em muitos aspectos, incluindo-se sua resistência a desenvolver obesidade⁴⁵⁻⁴⁷. Contudo, a resistência a desenvolver obesidade induzida pela alimentação parece estar na dependência de interações específicas entre microbiota e dieta⁴⁶.

Estudos futuros são necessários para esclarecer questões relacionadas à microbiota e à obesidade. Não está claro se o pequeno aumento na extração de energia poderia verdadeiramente culminar com um ganho de peso corporal dentro de curto período de tempo, como sugerido em alguns estudos de transplante de flora intestinal. Além disso, tem sido descrito em outros estudos que dietas ricas em fibras não digeríveis podem contribuir para a redução do peso, da massa gorda e da gravidade do diabetes^{48,49}.

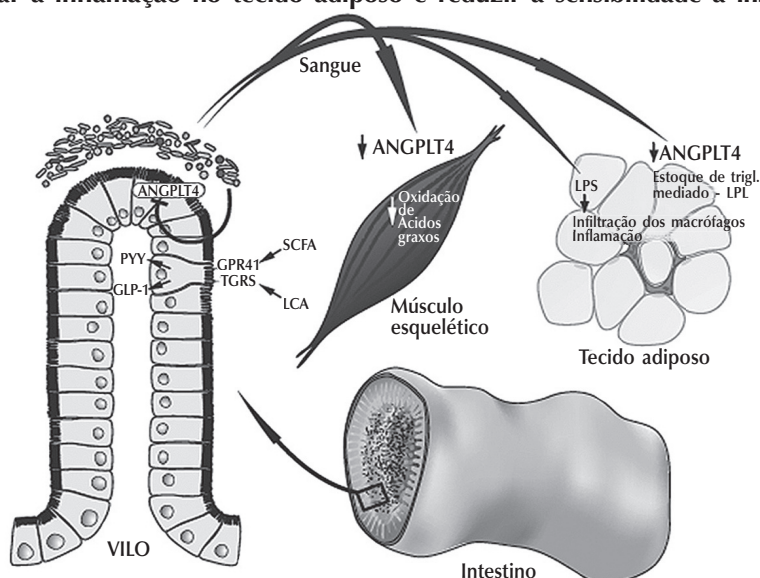
INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO SUBCLÍNICA

Recentemente, uma nova hipótese ligando a microflora intestinal com a homeostase metabólica foi proposta (Figura 2). Baseados na demonstração recente de que obesidade e diabetes tipo 2 estão associados a baixo grau de inflamação crônica sistêmica⁵⁰⁻⁵³ no fígado, tecido adiposo e hipotálamo, Cani e colaboradores⁵⁴ hipotetizaram que os lipopolissacárides bacterianos derivados de bactérias Gram-negativas residem na microbiota intestinal, agindo com um fator de gatilho e ligando a inflamação ao diabetes induzido pela dieta rica em gordura e à obesidade. Eles descobriram que dietas ricas em gordura resultaram numa significativa modulação das populações bacterianas dentro da microflora intestinal, que foram associadas com um significativo aumento de lipopolissacárides do plasma, massa gorda, ganho de peso corporal, acúmulo de triglicérides no fígado, resistência à insulina e diabetes.

Metabolismo e inflamação estão firmemente conectados e, particularmente, o sistema imune inato, o qual nos protege de infecções, pode contribuir para a obesidade e a resistência insulínica⁵⁵.

Além dos efeitos dos microrganismos no metabolismo do hospedeiro, a microbiota também contribui para anormalidades metabólicas por promover inflamação de baixo grau⁵⁶.

Figura 2 - A microbiota intestinal afeta o metabolismo do hospedeiro e a secreção de hormônios do intestino, podendo ter efeitos periféricos profundos no metabolismo do hospedeiro. A supressão microbiana da expressão de ANGPTL4 (Proteína Angiopoetina-like 4) no intestino aumenta o estoque de triglicérides mediado pela lipase lipoprotéica (LPL) no tecido adiposo, assim como, reduz a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético por um mecanismo ainda não identificado. Além disso, lipopolissacarídeos (LPS) derivados do intestino podem aumentar a inflamação no tecido adiposo e reduzir a sensibilidade à insulina.



Figuras publicadas no suplemento do *Annals of Nutrition and Metabolism* 2011, 58(suppl2) 44-52 e reproduzidas sob permissão

A MICROBIOTA INTESTINAL AFETA A PROGRAMAÇÃO METABÓLICA?

A incidência de diabetes tipo 1 entre crianças e adolescentes tem, por razões desconhecidas, aumentado consideravelmente nos países ocidentais durante as décadas recentes, sugerindo um envolvimento ambiental significativo⁵⁷. Em contraste, o diabetes tipo 2 e a resistência insulínica, na presença de um aumento da microbiota intestinal, sofrem progressão, enquanto a mesma condição parece ser protetora contra o diabetes tipo 1⁵⁸. Curiosamente, anormalidades metabólicas precedem ilhotas

de autoimunidade em crianças que progredirão mais tarde para diabetes tipo 1 independentemente do risco genético associado ao HLA⁵⁹, e essas alterações se assemelham àsquelas identificadas em ratos *germ-free*⁶⁰. Por conseguinte, em vez de primeiramente afetar o sistema imunitário, a microbiota intestinal pode alterar o ambiente metabólico, o que proporcionaria efeitos profundos sobre o sistema imunitário. Uma vez que o metaboloma alterado já foi observado em sangue do cordão umbilical, Bäckhed⁶¹ formulou a hipótese de que a microbiota do intestino da mãe pode ser transferida para a criança e que ela

progrediria no futuro para diabetes tipo 1 por ter sido destituída de importantes constituintes e/ou por ter a função intestinal comprometida, o que predisporia à instalação do diabetes tipo 1.

Em conjunto, esses achados sugerem que o manejo da composição da microbiota durante a gravidez ou na infância precoce poderia prover uma nova abordagem terapêutica para prevenir ou tratar essa doença⁶¹.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Evidências de que a composição da microbiota intestinal pode diferir entre seres humanos magros e obesos têm levado à especulação de que a microbiota pode participar da fisiopatologia da obesidade. Mecanismos diferentes têm sido propostos para explicar essas possíveis correlações. Contudo, muitas questões permanecem sem resposta. A princípio não está claro se pequenas diferenças de extração calórica podem levar a diferenças tão expressivas de peso corporal. Além do mais, é essencial provar se as diferenças de microbiota observadas em indivíduos obesos são causa ou consequência da obesidade¹.

O manejo da microbiota intestinal representa uma potencial abordagem no tratamento da obesidade. No entanto, o papel de prebióticos, probióticos e antibióticos na modulação da obesidade é desconhecido. Porém, no futuro eles poderiam ser utilizados como agentes

moduladores da microbiota e talvez tivessem um papel no tratamento da obesidade e de suas complicações¹.

Referências Bibliográficas

1. Midtvedt T. Atividades funcionais dos microorganismos. In: Probióticos, outros fatores nutricionais e microflora. Nestlé Nutrition Workshop Series Programa Pediátrico Nº 42. Vevey, Suíça: Nestec Ltd.; 1998. p. 11-3.
2. Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(18): 10452-9.
3. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007; 10(6): 729-34.
4. Bocci V. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. Perspect Biol Med. 1992; 35(2): 251-60.
5. Tsukumo DM, Carvalho BM, Carvalho-Filho MA, Saad MJ. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009; 53(2): 139-44.
6. Adlerberth I. Estabelecimento da microflora intestinal normal do recém-nascido. In: Probióticos, outros fatores nutricionais e a microflora intestinal. Nestlé Nutrition Workshop Series Programa Pediátrico Nº 42. Vevey, Suíça: Nestec, Ltd.; 1998. p. 7-10.
7. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. Pediatrics. 1983; 72(3): 317-21.
8. Pietzak M. Bacterial colonization of the neonatal gut. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004; 38(4): 389-91.
9. Bettelheim KA, Lennox-King SM. The acquisition of *Escherichia coli* by newborn babies. Infection. 1976; 4(3): 174-9.
10. Saavedra JM. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. Nutr Clin Pract. 2007; 22(3): 351-65.
11. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. Clin Exp Allergy. 1999; 29(3): 342-6.

12. Tannock G. The intestinal microflora. In: Fuller R, Perdígón G, eds. *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health*. Oxford, England: Blackwell Press; 2003. p. 1-23.
13. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JL. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*. 2009; 1(6): 6ra14.
14. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, *et al*. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *Isme J*. 2011; 5(2): 220-30.
15. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, *et al*. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. 2009; 137(5): 1716-24 e 1-2.
16. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, *et al*. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464(7285): 59-65.
17. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, *et al*. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009; 457(7228): 480-4.
18. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, *et al*. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005; 308(5728): 1635-8.
19. Ha EM, Lee KA, Seo YY, Kim SH, Lim JH, Oh BH, *et al*. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nat Immunol*. 2009; 10(9): 949-57.
20. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjoberg J, Amir E, *et al*. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol*. 2010; 11(1): 76-83.
21. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, *et al*. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(50): 18129-34.
22. Winkler P, Ghadimi D, Schrezenmeier J, Kraehenbuhl JP. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J Nutr*. 2007; 137(3 Suppl 2): 756S-72S.
23. Calder PC. Immunological parameters: what do they mean? *J Nutr*. 2007; 137(3 Suppl 2): 773S-80S.
24. Corthesy B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr*. 2007; 137(3 Suppl 2): 781S-90S.
25. Matsuzaki T, Takagi A, Ikemura H, Matsuguchi T, Yokokura T. Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity. *J Nutr*. 2007; 137(3 Suppl 2): 798S-802S.
26. Yuan Q, Walker WA. Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004; 38(5): 463-73.
27. Thomas DW, Greer FR. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics*. 2010; 126(6): 1217-31.
28. Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, Krajci P, Kvale D, Rognum TO, *et al*. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. 1989; 97(6): 1562-84.
29. MacDonald TT, Spencer J. Ontogeny of the gut-associated lymphoid system in man. *Acta Paediatr*. 1994; 83(395): 3-5.
30. Pickard KM, Bremner AR, Gordon JN, MacDonald TT. Microbial-gut interactions in health and disease. Immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004; 18(2): 271-85.
31. Ormala T, Rintala R, Savilahti E. T-cells and HLA-class II expression in the large intestine of infants in the early postnatal period. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998; 26(4): 422-8.
32. Crabbe PA, Bazin H, Eyssen H, Heremans JF. The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ-free intestinal tract. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1968; 34(4): 362-75.
33. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69(5): 1046S-51S.
34. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, *et al*. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30(1): 61-7.
35. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73(2 Suppl): 444S-50S.
36. MacDonald TT, Gordon JN. Bacterial regulation of intestinal immune responses. *Gastroenterol Clin North Am*. 2005; 34(3): 401-12, vii-viii.

37. Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut*. 2002; 51(1): 51-5.
38. Langhendries JP, Detry J, Van Hees J, Lamboray JM, Darimont J, Mozin MJ, *et al.* Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1995; 21(2): 177-81.
39. Bakker-Zierikzee AM, Alles MS, Knol J, Kok FJ, Tolboom JJ, Bindels JG. Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life. *Br J Nutr*. 2005; 94(5): 783-90.
40. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, Possner M, *et al.* Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(11): 4025-31.
41. Li Y, Shimizu T, Hosaka A, Kaneko N, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. Effects of *bifidobacterium breve* supplementation on intestinal flora of low birth weight infants. *Pediatr Int*. 2004; 46(5): 509-15.
42. Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, *et al.* Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature*. 2006; 440(7087): 1073-7.
43. Wostmann BS. The germfree animal in nutritional studies. *Annu Rev Nutr*. 1981; 1: 257-79.
44. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(44): 15718-23.
45. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JL. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(3): 979-84.
46. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br J Nutr*. 2010; 104(6): 919-29.
47. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gerard P, Harach T, Moser M, *et al.* Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *Faseb J*. 2010; 24(12): 4948-59.
48. Cani PD, Joly E, Horsmans Y, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. *Eur J Clin Nutr*. 2006; 60(5): 567-72.
49. Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res*. 2005; 13(6): 1000-7.
50. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005; 115(5): 1111-9.
51. Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR, Tsukumo DM, Velloso LA, Carvalheira JB, *et al.* Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *J Endocrinol*. 2008; 199(3): 399-406.
52. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, *et al.* S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2005; 54(4): 959-67.
53. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, *et al.* Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56(8): 1986-98.
54. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56(7): 1761-72.
55. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72: 219-46.
56. Cani PD, Hoste S, Guiot Y, Delzenne NM. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Br J Nutr*. 2007; 98(1): 32-7.
57. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002; 347(12): 911-20.
58. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, *et al.* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008; 455(7216): 1109-13.
59. Oresic M, Simell S, Sysi-Aho M, Nanto-Salonen K, Seppanen-Laakso T, Parikka V, *et al.* Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med*. 2008; 205(13): 2975-84.

60. Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigstad CS, Gopalacharyulu P, Yetukuri L, Islam S, *et al.* The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J Lipid Res.* 2010; 51(5): 1101-12.
61. Backhed F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Ann Nutr Metab.* 2011; 58 Suppl 2: 44-52.

DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL. FATORES PERINATAIS

Profa. Dra. Cléa Rodrigues Leone

Durante o período perinatal os órgãos e sistemas corpóreos sofrem muitas mudanças, que visam à adaptação do recém-nascido (RN) ao meio extrauterino e, conseqüentemente, a garantia de uma sobrevivência harmônica com o seu meio ambiente.

O desenvolvimento da microbiota intestinal (MI) constitui uma etapa fundamental nesse processo, especialmente considerando-se que se trata de um ecossistema complexo, que vem sendo moldado ao longo do tempo por meio de relações entre o hospedeiro e os microrganismos de seu micro e macroambiente, que é capaz de modular respostas imunes e promover a saúde. É importante salientar a importância da MI também para o desenvolvimento do sistema imune e na nutrição, com a síntese de vitamina K, ácidos graxos de cadeia curta e biotina.^{1,2}

Novas tecnologias, desenvolvidas a partir do Projeto Genoma Humano, têm propiciado um maior conhecimento desse sistema, bem como suas funções e mecanismos de ação nos processos de saúde e doença. Da mesma forma, recentes avanços em relação aos métodos de biologia molecular utilizados para a identificação das bactérias intestinais têm permitido a identificação e taxonomia da microbiota intestinal em grande profundidade, o que até então não era obtido por meio de culturas.³

No período neonatal, com base na literatura mais atual, considera-se que a microbiota intestinal seja complexa, com composição variável, de acordo com a ação de vários fatores, como: tempo de gestação, padrão de crescimento intrauterino, tipo de parto, idade, tipo de alimentação, ambiente da Unidade Neonatal, uso de antibióticos, intervenções médicas, entre outros.¹

I. CARACTERÍSTICAS DA MI AO NASCIMENTO

Conceitualmente, o trato gastrointestinal do feto ao nascimento é estéril, havendo colonização a seguir, a partir de microrganismos maternos e do meio ambiente.

No entanto, estudos experimentais atuais, realizados em mecônio de recém-nascidos pré-termo (RNPT), identificaram presença de DNA bacteriano nestes, sugerindo uma influência pré-natal. Nesse sentido, Mshvildadze

e colaboradores⁴, estudando a primeira eliminação após o nascimento de 21 RNPT com menos de 32 semanas de idade gestacional (IG), por meio de eletroforese por desnaturação em gel e reação em cadeia de polimerase (PCR), calcularam o Índice de Diversidade (ID) das bactérias presentes, tendo verificado que esse índice foi menor em RNPT com menos de 30 semanas de IG em relação aos com 30 semanas ou mais. Também menores índices foram observados em RN cujas mães tiveram rotura prolongada de membranas e que receberam antibiótico intraparto.

Da mesma forma, pesquisas em líquido amniótico (LA) em mães que entraram em trabalho de parto prematuro verificaram a presença de amplo espectro de DNA ribossomal bacteriano. A esse respeito, estudos baseados em PCR estimaram a presença de bactérias na cavidade amniótica em quantidades 30 a 50% maiores do que as verificadas anteriormente por culturas.⁵

A realização desses estudos baseia-se no fato de se considerar que o feto é capaz de deglutir 400 a 500 ml de LA por dia ao termo e a hipótese atualmente muito investigada é a de que o trabalho de parto prematuro seja desencadeado por ação de bactérias em LA. Entretanto, ainda não se tem conhecimento se o parto prematuro é uma decorrência ou não da resposta inflamatória estimulada por esses componentes bacterianos, nem de possíveis repercussões desses microrganismos sobre o desenvolvimento do sistema imune.

Portanto, o trato intestinal ao nascimento pode não ser estéril, especialmente em recém-nascidos prematuros.

Os resultados mais atuais, utilizando técnicas mais avançadas, com base em biologia molecular, têm levado a um avanço no conhecimento da constituição da MI ao nascimento e sua evolução de acordo com a interferência de fatores perinatais. No entanto, considera-se que estes sejam apenas estudos iniciais, que indicam a necessidade de realização de novas investigações em relação aos mecanismos de invasão bacteriana da cavidade amniótica e patogênese dos processos que podem se seguir a esta, como as respostas imunológicas maternas e fetais, além dos efeitos clínicos da presença de algumas espécies microbianas patogênicas. Esse novo conhecimento poderá contribuir para que se estabeleçam medidas de prevenção e tratamento mais eficientes nessa fase, reduzindo o risco de morbimortalidade perinatal. Em recém-nascidos (RN) de termo, considera-se que o intestino inicie colonização no primeiro dia de vida a partir da exposição às bactérias do canal de parto, nos partos vaginais, e à flora fecal materna, ao meio ambiente hospitalar, se admitido em alojamento conjunto, unidade semi ou intensiva neonatal, e em decorrência de sua manipulação pelos pais e membros da equipe. Essa colonização inicial seria feita por aeróbios facultativos, como *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Aos 10 dias deve apresentar uma flora heterogênea,

com predomínio de *Bifidobacterium* nos mantidos em aleitamento materno, além de *Bacteroides* e *Clostridium*.⁶ Em estudo pioneiro realizado na Suécia, foi estudada a composição da primeira microbiota 48 horas após o nascimento de 69 RN de termo adequados para a idade gestacional, após parto vaginal, por meio de PCR quantitativo. *Lactobacillus* foi detectado em todos os RN, enquanto *Enterococci*, que são bactérias oportunistas que podem causar infecção hospitalar, estiveram presentes em 30% dos casos. Estas últimas bactérias podem ter sido contaminantes do meio e não necessariamente originadas da mãe.⁷

No Brasil, foi realizada a avaliação do desenvolvimento da microbiota intestinal em RN de termo que nasceram de parto vaginal em Hospital Universitário em São Paulo e que receberam aleitamento materno exclusivo. Foram colhidas amostras fecais no segundo, sétimo e trigésimo dias de vida e usadas técnicas moleculares para análise da colonização intestinal dessas crianças. Observou-se nos primeiros dias a predominância de *Escherichia* e *Clostridium*, provavelmente adquiridos a partir do meio ambiente hospitalar, e baixa taxa de colonização por *Staphylococcus*. Estes resultados diferem dos obtidos em países desenvolvidos, nos quais se verificou predomínio dessa bactéria, provavelmente originada a partir da pele dos pais por contato direto.⁸

Esses resultados obtidos em países desenvolvidos e em desenvolvimento,

além de evidenciarem possíveis diferenças nas normas de prevenção de infecções entre essas unidades neonatais, que merecem ser revistas, também podem estar sinalizando uma colonização diversa. As repercussões dessas diferenças sobre o desenvolvimento da imunidade e do risco de doenças nessas duas situações ainda são desconhecidas. Já em pré-termos a colonização é mais lenta, principalmente em decorrência das intervenções realizadas nos que permanecem em UTI neonatais, como uso de antibióticos, nutrição parenteral e a permanência em incubadoras. Isto faz com que adquiram mais lentamente as bactérias residentes no intestino para constituir a flora intestinal, tornando-se mais susceptíveis à colonização patogênica.⁹

Além disso, possuem uma motilidade intestinal reduzida e predisposição a supercrescimento bacteriano. Estas características dos RNPT constituem fatores que contribuem para o maior risco de infecções nesse grupo. Nesses RN as bactérias mais frequentes identificadas em culturas de fezes têm sido enterobactérias, *Staphylococci*, *Enterococci* e *Bifidobacteriae*.

Em RNPT extremos, com menos de 30 semanas de IG, foram colhidas amostras de fezes a cada 3 dias, entre 3 e 56 dias de vida. Os dados relativos à microbiota fecal, por meio de análise molecular, variaram entre os pacientes e com a IG. Em cada RN, o índice de diversidade bacteriana aumentou 0,45 unidades por semana. Por análise univa-

riada, uma IG < 28 semanas, parto cesáreo, antibioticoterapia materna antenatal e uso precoce de antibióticos no RN associaram-se a maiores ID durante a evolução pós-natal. A maioria dos RNPT mais imaturos estavam colonizados por *Staphylococcus* durante o primeiro mês de vida, o que pode aumentar o risco de sepse tardia nesses RN.

Ainda nessa pesquisa, o ID às 6 semanas de vida correlacionou-se inversamente com a duração da antibioticoterapia tardia e da nutrição parenteral e diretamente com a duração do aleitamento materno. Foi verificado, ainda, que o ganho de peso nesse período foi maior com o aumento do ID. Também o desenvolvimento da microflora foi diferente entre os RN com intolerância alimentar ou ECN em relação aos com boa tolerância.

Esses resultados são muito importantes, pois podem reforçar um possível benefício do uso de probióticos nesses RN mais imaturos, que têm baixa colonização por *Bifidobacterium* e que evoluem com intolerância alimentar e ganho de peso insuficiente.¹⁰

A colonização inicial após o nascimento constitui a primeira microbiota e tem particular importância para a evolução do sistema imune ainda imaturo. Portanto, intervenções que possam contribuir para a formação de uma MI a mais próxima da esperada em RN considerados saudáveis deverão ser estimuladas sempre, depois de avaliadas quanto a sua segurança e efetividade, antes de se tornarem uma rotina.

II. FUNÇÕES DA MI NO RECÉM-NASCIDO

Têm sido atribuídas à microbiota de RN, mais frequentemente em RNPT, importantes influências sobre metabolismo, nutrição, funções imunológicas e defesa contra patógenos.

O equilíbrio da MI é fundamental para garantir a saúde do RN, pois a ocorrência de desbalanços pode levar ao desenvolvimento de doenças a curto e em longo prazo. Na fase neonatal precoce, podem ocorrer diarreia, sepse, má nutrição e enterocolite necrosante (ECN). Evidências atuais têm indicado que a não exposição a vários microrganismos em fase precoce da vida (Hipótese da Higiene) pode associar-se à ocorrência de doenças no futuro, como obesidade, diabetes, Doença de Crohn, alergias, asma e síndrome metabólica. Durante o período neonatal, a partir de estímulo pelas bactérias intestinais ao tecido linfóide associado ao intestino para produção de anticorpos contra patógenos na luz intestinal, o sistema imunológico irá desenvolver reações contra as bactérias estranhas, mas não reagirá contra as espécies consideradas não patogênicas (habitantes locais), desenvolvendo tolerância imunológica específica. Essas bactérias estão relacionadas à expressão de receptores celulares *Toll-like* nas células intestinais, que conferem ao intestino a capacidade de diferenciar os habitantes usuais (comensais) e os estranhos (patogênicos) na luz intestinal.¹¹

Particularmente em RNPT essas ações da MI são importantes, pois associadas à presença de IgA secretória e vários outros elementos das reações imunológicas locais irão determinar o grau de invasão bacteriana e ativação da cascata inflamatória relacionada ao desenvolvimento de ECN.¹

Estudos experimentais sugerem que a MI no período neonatal tem influência sobre o estado nutricional, o desenvolvimento do trato gastrointestinal e a manutenção da integridade da superfície mucosa.⁹ Particularmente o fortalecimento da barreira intestinal constitui um dos maiores desafios à MI, pois este obstáculo à passagem de bactérias patológicas intestinais ao meio interno, por translocação bacteriana, é um mecanismo de defesa fundamental para a proteção contra a ocorrência de sepse tardia a partir do trato intestinal.³ Essa disseminação bacteriana a partir da quebra da barreira intestinal agrava muito a evolução dos casos de ECN.¹²

Outra função da MI necessária à regulação da função intestinal nas mais diversas situações é sua ação sobre a motilidade por meio de interações com o sistema nervoso central. Assim, o cérebro é capaz de atuar sobre os organismos comensais intestinais, via modificações em motilidade, secreção e permeabilidade intestinal, ou diretamente, pela liberação de sinalizadores, como células cromafínicas, neurônios e células imunes. A comunicação da MI se faz por células epiteliais, sinalização mediada por receptores e, quando

ocorre aumento da permeabilidade, por estímulo direto de células hospedeiras na lâmina própria. Nesse canal de comunicação intestino-cérebro, as células cromafínicas funcionam como transdutores bidirecionais que regulam esse processo. Rupturas dessa integração podem participar da fisiopatologia de doenças funcionais e inflamatórias, agudas e crônicas.

Um dos sistemas mais importantes no controle da microflora intestinal é a motilidade intestinal por meio de remoção de bactérias em excesso no lúmen. Para que funcione normalmente, é necessária a coordenação entre neurônios extrínsecos, neurônios motores entéricos, células intestinais de Cajal e musculatura lisa. Este sistema nervoso entérico constitui um cérebro complexo integrativo e foi chamado por alguns autores de “segundo cérebro” por ser capaz de controlar a função intestinal.¹³

III. FATORES MATERNNOS E PERINATAIS

Fatores maternos e perinatais podem modificar a evolução “fisiológica” de constituição da microbiota intestinal após o nascimento. Alguns deles merecem destaque, em função de seus efeitos e da existência de estudos com metodologia mais atual sobre suas ações.

III.1. TIPO DE PARTO

O tipo de parto e sua relação com o desenvolvimento da MI no RN, além

de efeitos em longo prazo, têm sido objeto de vários estudos.

Tradicionalmente, considera-se que, nos partos vaginais, o feto/RN inicia sua colonização intestinal a partir da passagem pelo canal de parto em função do contacto com bactérias da vagina e do intestino maternos. Predominam nesse momento *Lactobacillus*, *Prevotella* e outras *Bifidobacteria*.¹⁴

Por outro lado, a colonização intestinal de RN após o parto cesáreo tem se mostrado com menor diversidade bacteriana e com flora semelhante à de superfícies, com predomínio de *Staphylococcus*. Tem sido mais lenta e tem em sua constituição *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides*.

Estudos de evolução em longo prazo têm sugerido que essa colonização intestinal inicial tem efeitos permanentes sobre o intestino, até 6 meses ou 7 anos após, de acordo com diferentes autores.^{15,16}

Considerando-se a influência da MI sobre o desenvolvimento pós-natal do sistema imune, o tipo de parto ganha uma importância maior por poder influenciar essa evolução. Dados epidemiológicos têm mostrado maior frequência de rinite alérgica, asma, diabetes tipo 1 e alergias alimentares em crianças nascidas de parto cesáreo em relação ao vaginal.^{17,18,19}

É interessante notar que o risco de asma aumentou 60% quando houve repetição do parto cesáreo sem rotura de membranas em relação aos casos nos quais houve rotura de membranas amnióticas e/ou trabalho de parto antes, conforme dados de literatura.^{19,20}

III.II. TIPO DE ALIMENTAÇÃO

A influência do tipo de alimentação oferecida ao RN sobre a MI tem sido objeto de inúmeros estudos, especialmente aqueles que avaliam a importância do aleitamento materno e seus efeitos benéficos. Incontestavelmente, a nutrição enteral inicia a promoção do desenvolvimento do ecossistema intestinal imediatamente, constituindo inclusive o início precoce da nutrição enteral mínima, preferentemente com o leite da própria mãe, uma das bases das recomendações mais atuais de nutrição de RNPT, especialmente nos mais imaturos. Esta decorre dos efeitos benéficos sobre o sistema de defesa do hospedeiro, digestão e absorção de nutrientes, função gastrointestinal, evolução do neurodesenvolvimento e bem-estar materno.

Em RNPT mais imaturos, devido a suas necessidades nutricionais especiais para crescimento, em consequência de sua imaturidade metabólica e do trato gastrointestinal, associadas à imaturidade do sistema imunológico e à presença de distúrbios que acompanham a prematuridade no período neonatal precoce, o fornecimento adequado de nutrientes torna-se uma tarefa mais complexa.

O leite humano (LH) contém elementos bioativos capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas e vírus, dentre esses a lactoferrina, IgA secretória e o peptídeo formado durante a digestão. Constitui importante fonte de *Lactobacillus*, provavelmente de

origem endógena, que são semelhantes aos probióticos industrializados pelo menos no que se refere a sobrevivência no trato gastrointestinal, produção de produtos antimicrobianos, aderência a células intestinais, produção de aminas biogênicas e padrões de resistência bacteriana. Também os oligossacarídeos presentes no LH têm ação prebiótica, que estimula a formação de flora bifidogênica.⁹

Assim, os RN que recebem LH exclusivo têm uma flora intestinal com predomínio de bifidobactérias e *Lactobacilli*.

Outros componentes do LH contribuem para essa ação protetora anti-inflamatória, como antioxidantes, fatores de crescimento epitelial, agentes protetores celulares e enzimas, capazes de degradar mediadores inflamatórios. A menor relação w6/w3, com maior proporção de w3 anti-inflamatórios em relação aos pró-inflamatórios w6, também contribui para essa ação.²¹

De acordo com o exposto acima, estudos clínicos de diferentes locais têm evidenciado esse maior efeito protetor do LH em RNPT, em relação à ocorrência de menores episódios de sepse tardia, ECN, diarreia, infecção urinária e menor necessidade de uso de antibióticos, quando comparados aos que receberam fórmula. Particularmente quanto à sepse precoce e à ECN, esses efeitos foram observados em RN que receberam mais de 50 ml/kg/dia de LH em relação aos que foram alimentados com menor quantidade de LH ou fórmula.²²

III.III. USO DE ANTIBIÓTICOS

Nos partos prematuros, o binômio mãe-filho recebe antibióticos muito frequentemente, especialmente se ocorreu rotura prolongada de membranas, mesmo sem evidência de infecção, como parte da abordagem para prevenção de infecção precoce no RN. Nos casos em que ocorreu parto prematuro sem causa definida, esta prática também é muito utilizada enquanto se realiza a investigação sobre infecção e se define a continuidade ou a suspensão do antibiótico no RN.¹⁹

Por outro lado, a literatura, em adultos, tem mostrado efeitos indesejáveis do uso de antibióticos sobre a MI, como redução da diversidade da microflora intestinal e predomínio de bactérias mais resistentes, que se mantêm mesmo após 2 anos dessa exposição.²³

Se os efeitos da antibioticoterapia verificados em adultos podem ser estendidos aos recém-nascidos, é importante que as indicações de esquemas antibióticos após o nascimento – como parte de rotinas de prevenção de infecções em situações de maior risco de ocorrência destas – sejam, cada vez mais, o mais restritas possível, evidentemente sempre se ponderando qual será o maior risco para o RN.

III.IV. DESVIOS DO CRESCIMENTO INTRAUTERINO

A influência de desvios do padrão de crescimento intrauterino considerado normal sobre a composição da MI

após o nascimento tem sido estudada utilizando-se técnicas mais atuais moleculares.

Nesse sentido, em amostras fecais de 79 RN nas primeiras 48 horas de vida, observou-se elevada prevalência de gram-negativos do tipo *Proteobacteria*, especialmente *Escherichia coli*, em RN considerados grandes para a idade gestacional. Como essas crianças mais frequentemente são o resultado de gestações em mulheres obesas, com ganho excessivo de peso durante a gestação, constituem uma população de risco metabólico em sua evolução, particularmente em relação a obesidade e diabetes tipo 1. No entanto, ainda não se tem conhecimento sobre a existência de mecanismos pelos quais essa MI possa modificar a homeostase na vida futura.²⁴ Por outro lado, o crescimento menor do que o normal, caracterizado como crescimento intrauterino restrito (CIUR) em RN, pode provocar colonização intestinal e fermentação bacteriana diferente da verificada em RN normais. Este efeito provavelmente decorre das modificações intestinais decorrentes do CIUR, como menor peso e comprimento intestinal, conforme evidenciado em humanos e em vários modelos animais.^{25,26}

Outros efeitos descritos do CIUR são alteração do desenvolvimento da mucosa do intestino delgado (número e comprimento das vilosidades, número de células por vilosidade e por cripta) e da capacidade proliferativa, redução das atividades de dissacaridases e aminopeptidases, além da capacidade

absortiva do duodeno e do jejuno em estudos experimentais.²⁷

Estas alterações podem aumentar a disponibilidade de compostos não digeridos no lúmen e do potencial para fermentação bacteriana, modificando a colonização.

Com base nesses aspectos, estudo realizado em ratos verificou que a presença de CIUR aumentou consideravelmente a densidade bacteriana e, numa intensidade menor, a composição da microbiota do ceco e do cólon, que persistiram durante a evolução dos animais. Os autores questionaram o quanto essas alterações poderão trazer consequências na fisiologia intestinal e/ou na predisposição a patologias do intestino.²⁷

As consequências no período neonatal e após da ocorrência de desvios do crescimento intrauterino sobre o balanço metabólico e funcional do intestino ainda são desconhecidas, mas os estudos atuais abrem um caminho para que novas pesquisas procurem investigar essas relações.

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O avanço do conhecimento sobre o desenvolvimento da microbiota intestinal após o nascimento vem crescendo ao longo do tempo à medida que se desenvolvem novas técnicas de análise utilizando-se recursos da biologia molecular. A partir destas informações, tem sido possível avaliar sua importância para o desenvolvimento do trato gas-

trointestinal e do sistema imune, bem como sua capacidade de modular respostas imunes e atuar sobre o equilíbrio metabólico do recém-nascido, promovendo a saúde futura. A identificação de fatores perinatais capazes de alterar seu equilíbrio, com repercussões sobre o balanço metabólico e imunológico futuro, e o consequente desenvolvimento de doenças crônicas são de fundamental importância para que se possa estabelecer estratégias efetivas de prevenção de doenças.

Particularmente em relação ao uso de probióticos, prebióticos e simbióticos em RNPT, a Academia Americana de Pediatria e a Sociedade Europeia de Gastreenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica, em recomendação atual, consideram que não existem evidências conclusivas (Nível 1^a) para recomendar seu uso rotineiro em todos os RNPT.^(28,29)

V. Referências bibliográficas

1. Torrazza RM, Neu J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J Perinatol*. 2011;31:S29-S34. Doi:10.1038/jp.2010.172.
2. Round JL, Mazmanian. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunol*. 2009;9:313-323.
3. Indrio F, Neu J. The intestinal microbiome of infants and the use of probiotics. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23:145-150.
4. Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, Li N, Mai V. Intestinal microbiological ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J Pediatr*. 2010;156:20-25.
5. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2012;17:2-11.
6. Koenig JE, Sport A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(suppl 1):4578-4585.
7. Karlsson CLJ, Molin G, Corrado MC, Ahrné S. The pioneer gutmicrobiota in human neonates vaginally born at term. *Pediatr Res*. 2011;70:282-286.
8. Brandt K, Taddei CR, Takagi EH, Oliveira F, Duarte RTD, Irino I et al. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. *Clinics*. 2012;67(2):113-123.
9. Caicedo A, Schanler RJ, Li N, Neu J. The developing ecosystem: implications for the neonate. *Pediatr Res*. 2005;58:625-628.
10. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Picaud JC. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr*. 2011;158:390-396.
11. Mshvildadze M, Neu J. The infant microbiome: friend or foe? *Early Human Development*. 2010;86:S67-S71.
12. Sharma R, Young C, Neu J. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J Biomed Biotech*. 2010. DOI:10.1155/2010/305879.
13. Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6:306-314.
14. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Flerer N et al. 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.
15. Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;28:19-25.
16. Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*. 2004;53:1388-1389.
17. Negele K, Heinrich J, Borte M, von Berg A, Schaaf B, Lehmann I et al. Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;15:48-54.

18. Eggesbo M, Botten G, Stigum H, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy? *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:420-426.
19. Neu J, Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clin Perinatol.* 2011;38:321-331.
20. Renz-Polster H, David MR, Buist AS et al. Cesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(11):1466-1472.
21. Leone CR, Delgado AF. Nutrição na sepse em recém-nascidos pré-termo. IN Pereira GR, Leone CR, Alves Filho N, Trindade Alves O (coorden.). *Nutrição do Recém-nascido Pré-termo.* Rio de Janeiro: MedBook. Editora Científica Ltda. 2008; p. 193-211.
22. Schanler RJ, Schulman RJ, Lau CS, Smith EO, Heitkemper MM. Feeding strategies for premature infants: randomized trial of gastrointestinal priming and tube-feeding method. *Pediatrics.* 1999;103:434-439.
23. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 2007;1:56-66.
24. Karlsson CLJ, Molin G, Cilio CM, Ahrné S. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term – a pilot study. *Pediatr Res.* 2011;70:282-286.
25. Shanklin DR, Cooke RJ. Effects of intrauterine growth on intestinal length in the human fetus. *Biol Neonate.* 1993;64:76-81.
26. Wang T, Huo YJ, Shi F et al. Effects of intrauterine growth retardation on development of the gastrointestinal tract in neonatal pigs. *Biol Neonate.* 2005;88:66-72.
27. França-Berthon P, Hoebler C, Mouzet E, David A, Michel C. Intrauterine growth restriction not only modifies the cecocolonic microbiota in neonatal rats but also affects its activity in young adult rats. *JPGN.* 2010;51:402-413.
28. Murguía-Peniche T, Mihatsch W A, Zegarra J, Supapannachart S, Ding ZY, Neu J. Intestinal mucosal defense system. Part 2. Probiotics and prebiotics. *J Pediatr.* 2013; 162:S64-71.
29. Hickey L, Jacobs SE, Garland SM, ProPrens Study Group. *Pediatr Child Health* 2012; 48:777-83.

A INTERAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA E O SISTEMA IMUNE DE MUCOSA DO TRATO GASTROINTESTINAL

Profa. Dra. Cristina Miuki Abe Jacob

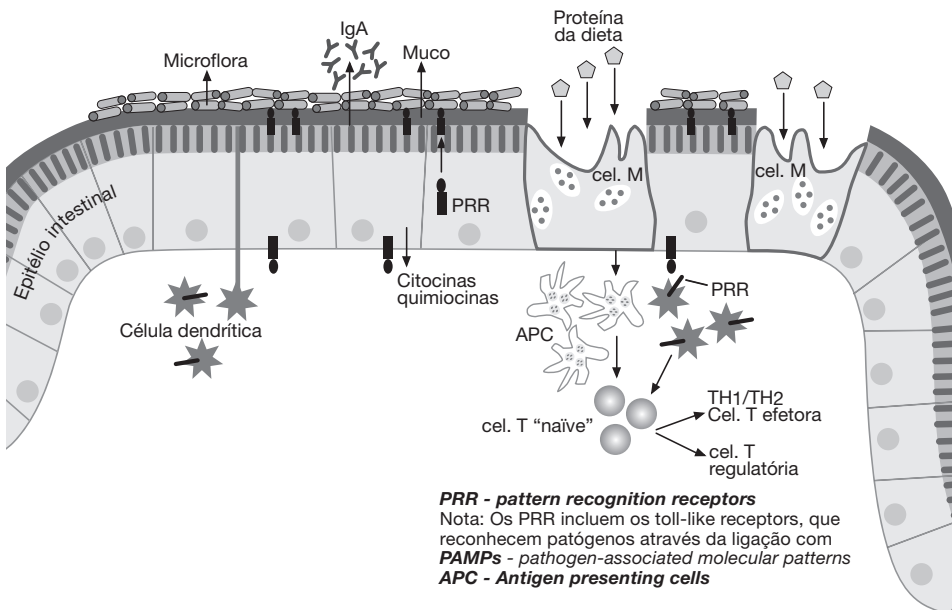
O sistema imune de mucosa do trato gastrointestinal denominado GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), além de representar uma importante estrutura de organização do sistema imune de mucosas, é reconhecido hoje como o local onde ocorre a interação entre o sistema imune e a microbiota, assegurando-se um balanço homeostático caracterizado por resposta ativa contra patógenos e uma hiporresponsividade à microbiota intestinal.¹

Nas últimas décadas, houve importante expansão do conhecimento sobre a estrutura e a função dos vários compartimentos do sistema imune de mucosas, em especial do GALT, tornando-o o cenário principal do desenvolvimento de tolerância oral. Desde então, este sistema é descrito como uma rede integrada de tecidos, células e moléculas efetoras, que em conjunto com a microflora protegem o organismo de insultos infecciosos e ambientais. Sua composição inclui as células epiteliais, a placa de Peyer, as células do sistema imunológico e os linfonodos mesentéricos (Figura 1). Atualmente a microbiota faz parte deste sistema, evidenciando-se

cada vez mais sua inter-relação com as células do sistema imunológico do trato gastrointestinal (TGI). A importância dessa rede de intercomunicações e de seus efeitos em locais distantes fica evidente por estudos que mostram que a administração de antibióticos no

período neonatal tem sido associada ao desenvolvimento de asma, sugerindo-se que alterações na microflora intestinal podem afetar os pulmões, provavelmente em decorrência da integração entre os vários sistemas de mucosas.²

Figura 1 - Sistema imune de mucosa do trato gastrointestinal e sua relação com a microbiota



A microbiota intestinal humana é um complexo ecossistema com cerca de 10^{12} - 10^{14} microrganismos, cuja composição varia de acordo com idade, dieta, ambiente e medicações. Vários autores têm enfatizado a associação entre estilo moderno de vida, composição da microbiota e risco de desenvolvimento de doenças imunoalérgicas.^{3,4} Em consequência deste fato, muitas estratégias de manipulação da microbiota intestinal estão sendo avaliadas como imunomodulação e controle de

doenças crônicas imunomediadas.^{5,6} Atualmente, a microbiota é reconhecida como um fator responsável pelo desenvolvimento da arquitetura intestinal e do sistema imune de mucosas. Este ecossistema tem importante papel na diferenciação da célula dendrítica, através do *Toll-like receptor 4* (TLR-4), ressaltando-se o elo entre a imunidade inata e a adaptativa no processo de tolerância oral.⁷ A microbiota intestinal é fundamental na aquisição de nutrientes, na defesa

contra a colonização por patógenos e no desenvolvimento do sistema imunológico. Vários experimentos com animais *germ-free* têm revelado a importância da microbiota na formação do GALT. Camundongos que perderam a microbiota intestinal apresentam pobre desenvolvimento de placas de Peyer, folículos linfoides da mucosa e linfonodos mesentéricos, o que ressalta o papel das bactérias comensais na estruturação do GALT. Interessante é o fato de que a colonização com um simples tipo de bactéria reverte este achado.⁸ Outros grupos de pesquisadores têm mostrado o papel da microbiota também na angiogênese e no desenvolvimento tanto da imunidade inata quanto adaptativa do intestino.^{9,10} Além destes achados, constata-se que em animais *germ-free* também se observa redução do número de linfócitos produtores de IgA e de células T CD4⁺, o que resulta em alterações importantes de função do GALT.¹¹ Evidências apontam que determinadas espécies da microbiota podem ter papel específico na indução de resposta imune do GALT. Bactérias filamentosas podem promover a diferenciação de linfócitos TH17, e *Clostridium spp* podem promover o desenvolvimento de células T regulatórias.¹²

INTERAÇÃO ENTRE MICROBIOTA E SISTEMA IMUNE DO TRATO GASTROINTESTINAL

O TGI representa o sítio primário da interação entre o hospedeiro e a

microbiota. Atualmente, o grande foco de estudo está em como a microbiota intestinal influencia o desenvolvimento e a função dos órgãos linfoides do GALT, em especial as células efectoras e regulatórias. As bactérias da microbiota estão mergulhadas na camada de muco que cobre todo o epitélio intestinal e funciona não apenas como barreira física mas também como importante mediador de interação entre células epiteliais e microbiota, sendo sua função também afetada por este ecossistema. A teoria mais aceita deriva da hipótese elaborada por Metchnikoff, há cem anos, que postulava que microrganismos específicos da microbiota poderiam influenciar o balanço entre as respostas inflamatória e regulatória no intestino e que alterações nesta constituição poderiam se relacionar com o desenvolvimento de doenças inflamatórias. Embora esta proposta seja bastante antiga, cada vez mais a visão atual da influência deste ecossistema no desenvolvimento de doenças não só intestinais mas também autoimunes tem sido associada a alterações da microbiota intestinal.

Outro fator associado à microbiota e à função imune tem sido o sistema mucociliar. A camada de muco do cólon consiste de duas camadas estratificadas, compostas principalmente de mucina secretada, a qual é glicosilada e rica em oligossacarídeos complexos.¹³ A camada mais interna é de composição densa e sem bactérias,

enquanto a camada externa alberga a microbiota. Esta localização pressupõe uma possível função em relação a estes microrganismos, já que sequestra muitos fatores produzidos pela célula epitelial, tais como fator de crescimento, fator trefoil e peptídeos bacterianos. O fator trefoil é um peptídeo resistente à protease e apresenta função semelhante a um fator de crescimento, sendo responsável pela integridade do epitélio intestinal, além de representar um componente do sistema de defesa do TGI. Uma das hipóteses é de que, por ocasião de insultos que promovam uma quebra desta barreira de muco, estes fatores seriam liberados, alertando o hospedeiro e controlando a penetração da microbiota nos tecidos adjacentes.²

Uma das principais funções da microbiota é o desenvolvimento de Tolerância Oral (TO). Este fenômeno é definido como uma ausência de reações do sistema imune à exposição a um antígeno já conhecido. No TGI, antígenos particulados são captados principalmente pela célula M, que é uma célula do epitélio intestinal diferenciada, embora sejam também captados pela célula dendrítica (CD), que é a célula apresentadora de antígenos profissional.¹⁴ Para diferenciação dessa célula e apresentação do antígeno às células do GALT que geram uma resposta tolerogênica, é fundamental que haja um estímulo tolerogênico. Em condições fisiológicas, para que a CD desempenhe

um papel tolerogênico, é necessário que a mucosa intestinal favoreça essa diferenciação através da produção de citocinas tolerogênicas, tais como Interleucina 10 (IL-10) e *Transforming Growth Factor* β (TGF- β).

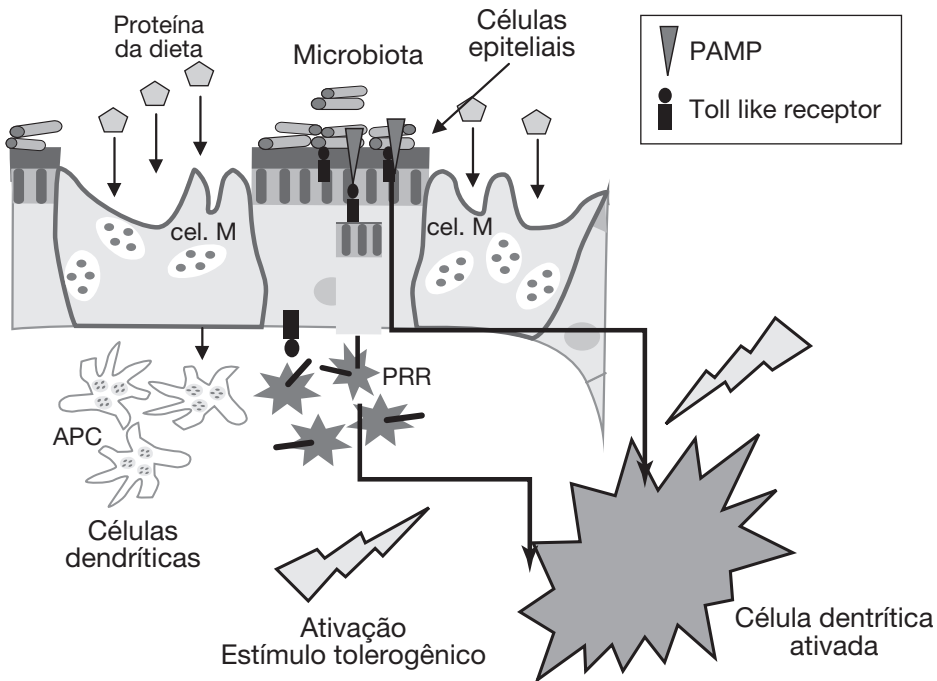
Recentemente, a importância fundamental do epitélio intestinal e da microbiota tem sido ressaltada.¹⁵

As células epiteliais da mucosa intestinal representam um papel fundamental no sistema imune do GALT. Anteriormente se valorizava apenas seu papel como barreira física em associação com o sistema mucociliar. Atualmente, o epitélio intestinal é considerado um órgão participante do sistema de mucosas do TGI, já que produz citocinas, hormônios, fatores de crescimento e participa efetivamente da ativação das CD para apresentação antígenoica. À semelhança das células imunocompetentes da mucosa, também possui receptores denominados *Pattern Recognition Receptors* (PRR), entre os quais os Toll-like receptors (TLR) e os *Nucleotide Oligomerization Domain* (NOD) se incluem. Os Toll-like receptors são constituídos de 13 estruturas localizadas na membrana da célula e reconhecem os PAMPs (*Pathogen-s Associated Molecular Patterns*) apresentados pelos microrganismos. Entre eles, merece destaque o *Toll-like receptor 4* (TLR-4), que reconhece o PAMP associado ao lipopolissacarídeo (LPS). Este fenômeno, além de promover a diferenciação e a maturação da célula dendrítica, é associado a uma

resposta tolerogênica do GALT e representa a ligação entre a imunidade inata e a adaptativa no processo de TO.^{16,17} Além desse fenômeno, a ativação das células epiteliais também estimula a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células de Paneth,

localizadas no epitélio das criptas, e de quimiocinas. Os peptídeos reforçam a ação protetora exercida pelo epitélio, funcionando agora como uma barreira físico-química e limitando o crescimento bacteriano e o acesso ao intestino.¹⁸

Figura 2 - **Ativação da célula dendrítica pela microbiota intestinal**



A maturação do GALT, a secreção da imunoglobulina A (IgA) e a ativação de células T na mucosa dependem dos estímulos derivados da microbiota, que regulam também a inter-relação das células dendríticas e das células epiteliais, além da resposta imune dos linfócitos T e B.¹⁹ Um importante fenômeno que ocorre após a colonização microbiana do intestino é a produção de IgA por células imu-

nocompetentes do GALT. As células plasmáticas localizadas na lâmina própria das vilosidades intestinais produzem cerca de 40 a 60 mg/kg de IgA. Esta IgA é transportada através do epitélio para a luz intestinal, onde auxilia na proteção contra infecções bacterianas, virais e parasitárias. Grande parte desta IgA é do tipo IgA2, mais resistente a proteases, conservando assim sua função imune.

A adesão da IgA a antígenos da dieta neste compartimento também auxilia na proteção contra a alergia alimentar. No neonato, o sistema imune ainda não completou sua fase de maturação, e durante a amamentação o leite materno auxilia na proteção do intestino do neonato através da passagem, pelo leite, de IgA e linfócitos já primados no sistema imune materno. Estes linfócitos apresentam capacidade de produção de IgA secretórias específicas para antígenos aos quais a mãe foi exposta, o que mostra que a proteção materna pelo aleitamento é de especial importância em uma fase em que existe uma incompetência fisiológica do intestino da criança na proteção contra proteínas alergênicas da dieta e antígenos bacterianos.²⁰

Na indução do processo de TO, o papel da CD103⁺ do intestino e do ácido retinoico é de fundamental importância pelo fato de que este tipo celular é produtor de TGF- β , uma potente citocina tolerogênica que estimula a produção de IgA, uma imunoglobulina predominante no intestino. As células epiteliais intestinais produzem tanto TGF- β como IL-10, que também é tolerogênica. Estas citocinas, em especial o TGF- β , são responsáveis pela indução de células T reguladoras (Treg), um tipo celular envolvido na TO.¹⁷

A importância do ácido retinoico no processo de TO tem sido cada vez mais fundamentada pelo fato de que as CD necessitam desse ácido para

sua ativação no intestino, com expressão de receptores associados ao *homing* destas células. Entende-se por *homing* o fato de que estas células circulam por vários sítios do intestino, exercendo sua função imune. Outro fato interessante é que estas células também induzem a produção de Treg Foxp3⁺ via produção de TGF- β , que em associação com o ácido retinoico amplifica este fenômeno. Assim, este ambiente de citocinas tolerogênicas iniciado pela estimulação de células dendríticas pela microbiota favorece uma resposta de tolerância, o que faz com que não haja uma resposta inflamatória a antígenos novos em contato com o indivíduo. Qualquer interferência neste processo (como mudanças na constituição da microbiota natural) poderia quebrar o processo de tolerância. Este conceito se aplica não apenas a doenças alérgicas mas também às autoimunes, tais como diabetes, doenças inflamatórias intestinais e reumatológicas.

O conhecimento do processo de TO tem estimulado vários pesquisadores a usar o trato gastrointestinal como cenário de vários procedimentos terapêuticos de indução de tolerância, tais como a dessensibilização oral, como tentativa da indução de TO em pacientes com alergia alimentar persistente.²¹

A importância do papel da microbiota adequada para desenvolvimento de tolerância também tem sido um conceito utilizado como estratégia

terapêutica imunomodulatória, já que em muitas doenças autoimunes e/ou inflamatórias têm sido constatadas alterações da microbiota fisiológica. Doenças crônicas, em especial aquelas alérgicas ou autoimunes, têm sido o alvo para o restabelecimento da microbiota intestinal benéfica. Nestes casos, o uso de probióticos tem sido uma alternativa terapêutica para muitas doenças²². Recentemente, Kuitunen M avaliou os mais recentes estudos sobre os efeitos da suplementação de probióticos na prevenção da alergia alimentar e eczema atópico²³. Entre as várias doenças atópicas, o efeito mais notável é em relação ao eczema atópico, onde mais da metade dos estudos mostram redução da doença até 2 anos, enquanto os outros estudos falham em mostrar esta evidência. Os efeitos mais consistentes ocorrem no uso combinado de suplementação no período antenatal e pós-natal na criança, em especial com o uso de *Lactobacillus rhamnosus*. Intervenções isoladas nestes períodos falham em mostrar efeitos. Em recente estudo de seguimento a longo prazo destes pacientes, Wickens et al mostraram que o efeito benéfico se mantém até a idade de 4 anos²⁴. Eigenmann PA também revisou a literatura sobre o papel de probióticos e prebióticos na prevenção do eczema infantil e conclui que²⁵:

a) a microflora intestinal interage com o sistema imunológico do hospedeiro e pode proteger do desen-

volvimento de sintomas alérgicos precoces.

- b) os estudos de precoce suplementação de probióticos e prebióticos para prevenção de dermatite atópica, ainda são conflitantes.
- c) o efeito protetor encontrado em alguns estudos é fortemente associado à cepa de probiótico escolhida, sendo o *Lactobacillus rhamnosus* a que mais demonstrou modular benéficamente o sistema imune.
- d) intervenções mais eficientes poderiam combinar probióticos e prebióticos em associação a outras intervenções, já que até o momento a estratégia ótima para prevenção permanece a ser definida.

Concluindo, podemos afirmar que a composição da microbiota intestinal exerce papel fundamental na saúde do hospedeiro. As intervenções de prevenção para doenças atópicas com probióticos e prebióticos podem ser possíveis, mas novos estudos de seguimento a longo prazo deverão ser desenvolvidos para confirmar o efeito benéfico desta estratégia.

Referências bibliográficas

1. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:331-41.
2. Gill N, Wlodarska M, Finlay BB. The future of mucosal immunology: studying an integrated system-wide organ. *Nature Immunol*. 2010;11:558-60.
3. Schwertz A, Jacobi M, Frick JS *et al*. Microbiota in pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr*. 2010;157:240-4.

4. Ehlers S, Kaufmann SHE. Infections, inflammation and chronic diseases: consequences of a modern lifestyle. *Trends Immunol.* 2010; 31:184-90.
5. Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates, *Pediatrics.* 2010;125:921-30.
6. Shanahan F. The colonic microflora and probiotic therapy in health and disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011;27:61-5.
7. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut.* 2005;54:1182-93.
8. Masmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.* 2005; 122:107-18.
9. Ivanov II. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe.* 2008;4:337-49.
10. Rakoff-Nahoum S, Pagano J, Eslami-Varzaneh F *et al.* Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004;118:229-41.
11. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Review Immunol.* 2004;4:478-85.
12. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science.* 2011;331:337-41.
13. Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A *et al.* The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2008;105(39):15064-9.
14. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:3-12.
15. Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol.* 2010;10:735-41.
16. Strobel S, Mowat AM. Oral tolerance and allergic response to food proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006;6:207-213.
17. Weiner HL, Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2011;241:241-59.
18. Suzuki K, Fagarasan S. How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut. *Trends Immunol.* 2008;29(11):523-31.
19. Rescigno M. Dendritic cells in oral tolerance in the gut. *Cel Microbiol.* 2011;13(9):1312-8.
20. Hurley WL, Theil PK. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients.* 2011;3:442-74.
21. Noh G. Oral Tolerance Induction for Human Food Allergy. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2012, 11(2):131-42.
22. Khani S, Hosseini HM, Taheri M, Nourani MR, Imani Fooladi AA. Probiotics as an Alternative Strategy for Prevention and Treatment of Human Diseases: A Review. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2012, 11(2):79-89.
23. Kuitunen M. Probiotics and prebiotics in preventing food allergy and eczema. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013,13:280-6.
24. Wickens K, Black P, Stanley TV *et al.* A protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 against eczema in the first 2 years of life persists to age 4 years. *Clin Exp Allergy* 2012, 42: 1071-9
25. Eigenmann PA. Evidence of preventive effect of probiotics and prebiotics for infantile eczema. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013, 13: 426-31

A MICROBIOTA INTESTINAL E AS AFECÇÕES DO TRATO DIGESTÓRIO

Prof. Dr. Mauro Sergio Toporovski

No corpo humano estima-se a existência de aproximadamente 10^{14} células, das quais aproximadamente 90% são representadas por bactérias não patogênicas que compõem a microflora aeróbica e anaeróbica do intestino. Parte destes microrganismos adere à superfície das células epiteliais e outros ficam em suspensão na camada de muco intraluminal.¹

A aderência bacteriana é modulada pelo pH luminal, características da superfície e presença de fibronectina. As bactérias intraluminais constituem 40% do peso fecal, porém não representam necessariamente as mesmas cepas que permanecem em simbiose nos diferentes segmentos intestinais.

A maioria dessas bactérias são anaeróbias de difícil cultivo e identificação pelos métodos tradicionais. Nos últimos anos, o desenvolvimento dos métodos de genética molecular, tais como técnicas de PCR, hibridização dos ácidos nucleicos e “probes” de 16 sRNA, permitiu detectar e estudar as diferentes cepas que compõem a microbiota, sem a necessidade de cultivá-las em meios de cultura.²

A habilidade do hospedeiro humano de processar os nutrientes e de controlar a

resposta imune é dependente do equilíbrio da flora indígena representada pelo microbioma. Os diferentes tipos de dieta alimentar, estilo de vida, uso de medicações e antibióticos geram interferências no metabolismo das células intestinais, sendo estes fatores que estimularam nos últimos anos as pesquisas no sentido de manter a microflora estável, reduzindo o impacto negativo dos eventos adversos sobre a saúde humana.³

A colonização do intestino inicia-se logo após o nascimento, sendo detectadas bactérias no mecônio nas primeiras 4 horas de vida. O parto vaginal propicia rápida colonização por anaeróbios, que representam 96% da flora intestinal, predominando o *B. fragilis*. Quando o parto é cirúrgico há um retardo da colonização, especialmente por anaeróbios, que passam a representar apenas 59% do montante, com menor proporção do *B. fragilis*. O parto natural favorece o estabelecimento de uma microbiota intestinal mais equilibrada e determina um pH intraluminal mais ácido, o que confere benefícios nas primeiras semanas de vida.⁴ Esses efeitos não se relacionam com a prevalência de sintomas gastrointestinais em idades mais avançadas no que concerne a flatulência, cólicas abdominais, distensão abdominal e sangue nas fezes.⁵

O lactente em aleitamento natural tem flora predominante de *Lactobacillus sp.* e *Bifidobacterium*, enquanto os alimentados por fórmula desenvolvem

flora representada principalmente por *Bacteroides*, *E. coli*, *Enterococcus* e *Clostridium*. Os lactobacilos são parte da flora subdominante e as bifidobactérias representam a flora ativa dominante; os dois grupos em equilíbrio estimulam a resposta imune e inibem a adesão de microrganismos patogênicos, tanto bactérias quanto fungos.⁶

TRATO DIGESTÓRIO E MICROBIOTA INTESTINAL

O estômago é considerado “relativamente estéril”, contendo menos do que 10^3 unidades formadoras de colônias (UFC) decorrente do pH intraluminal ácido. A flora é predominante aeróbica e gram-positiva. No intestino delgado a colonização aumenta para 10^3 e 10^4 UFC, com pouca presença de bactérias anaeróbicas.

A acidez gástrica e o peristaltismo intestinal são importantes para a proteção contra o sobrecrecimento bacteriano no trato digestório. Quando ocorre diminuição na produção ácida aumentam as chances de colonização de microrganismos patogênicos, tais como *Vibrio cholerae*, *Candida sp.*, *Campylobacter sp.* e *Strongyloides stercoralis*, entre outros. Esse efeito protetor é mais bem observado em crianças que vivem em áreas com baixos indicadores socioeconômicos.⁷

Os ácidos biliares também exercem papel de proteção contra a contaminação intestinal. No íleo distal, aumenta a população bacteriana para em torno

de 10^7 UFC/ml, predominando bactérias gram-negativas e anaeróbios dos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* e *Clostridium*. No intestino grosso, o número de bactérias atinge 10^{11} a 10^{12} UFC/ml, sendo a concentração de anaeróbios 1.000 vezes maior que a de aeróbios⁸. A flora intestinal, primordialmente anaeróbica, exerce importante papel protetor contra as infecções por enteropatógenos, através de um eficiente processo fermentativo, reduzindo o pH intraluminal e produzindo os ácidos acético, propiônico e butírico.⁹

Os lactobacilos aderem aos receptores de manose das células epiteliais inibindo a adesão de microrganismos nocivos. As bactérias da microbiota produzem bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, que igualmente reforçam a ação protetora.¹⁰

Há uma relação entre imunidade e população bacteriana indígena, relação essa necessária para o desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), que é, por sua vez, constituído por aproximadamente 70% das células imunológicas do organismo humano.¹¹

A simbiose entre microflora e hospedeiro é estabelecida quando a interação dos mesmos exerce uma ação fisiológica ou bioquímica benéfica. A betaglucuronidase e sulfatases bacterianas são responsáveis pela circulação êntero-hepática de várias substâncias, tais como ácidos biliares, bilirrubinas, estrógenos, colesterol e medicamentos.

Há igualmente maior produção de ácidos graxos, degradação de mucinas, ureia, aumento da síntese de vitamina K, B12, riboflavina e folatos.¹² A supressão da microflora produzida por antibióticos reduz a circulação êntero-hepática de várias substâncias, reduzindo a concentração de alguns hormônios.

Tabela 1 - Efeitos da flora bacteriana enteral

Efeitos benéficos	Efeitos adversos
Exclusão competitiva de patógenos	Competição por calorias e nutrientes essenciais
Produção de ácidos graxos de cadeia curta	Produção de metabólitos irritantes da mucosa (ácidos biliares desconjugados)
Síntese de vitaminas e nutrientes	Produção de substâncias carcinógenas
Degradação de mucina intestinal e ureia	Efeito direto das bactérias sobre a mucosa
Circulação êntero-hepática de metabólitos	Exacerbação da resposta inflamatória
Conversão de urobilina em urobilinogênio	
Conversão de colesterol em coprostanol	

Adaptado de Batt et al. (1996)¹³ J Small Animal Prac 1996;37:261-67.

Deve-se frisar que a quantidade e o tipo de bactérias detectadas nas amostras fecais não representam necessariamente o que coloniza os diferentes segmentos do intestino. Tomem-se, por exemplo, as amostras de bactérias que normalmente colonizam o ceco; são iguais às detectadas nas fezes, porém a quantidade é aproximadamente 100 vezes menor.

FLORA BACTERIANA NA DOENÇA

Durante o curso de infecções hospitalares, em muitos casos observa-se

colonização bacteriana no intestino pelos mesmos agentes patogênicos, sugerindo que ocorra translocação do trato digestório para a corrente circulatória como mecanismo deflagrador da infecção. Devido a esse fato, muitos serviços de UTI pediátrica têm como rotina utilizar antibióticos não absorvíveis para “descontaminar” o trato digestivo dos pacientes com afecções graves. Estes pacientes críticos geralmente estão expostos às infecções decorrentes do jejum prolongado, uso de bloqueadores ácidos e antimicrobianos. São considerados fatores

agravantes a redução da ingestão oral, a diminuição da motilidade intestinal e o uso de antiácidos protetores da mucosa gástrica.¹⁴

Alguns autores observaram que o emprego de antiácidos altera a microflora intestinal, favorecendo a colonização por bactérias patogênicas no trato digestivo. Moulin et al.¹⁵ constataram em pacientes críticos um aumento da ocorrência de infecções respiratórias quando do emprego de medicação antiácida. Esses dados suscitam dúvidas a respeito dessa prática em pacientes gravemente enfermos, uma vez que há riscos maiores de colonização por bactérias determinantes de infecções urinárias, peritonites e septicemias¹⁶. A nutrição parenteral total pode determinar aumento da concentração de bactérias patogênicas no ceco, porém esta não parece ser a principal via de infecção para os pacientes.

FLORA BACTERIANA E ALERGIA

A ocorrência de alergia alimentar, embora não completamente entendida, é nos primeiros meses de vida notadamente mais elevada quando comparada ao que se detecta em idades mais avançadas. Considera-se como um dos fatores predisponentes mais importantes a barreira intestinal ainda imatura e mais vulnerável à sensibilização alérgica. A microbiota atua estimulando os sistemas naturais de defesa e modula a resposta imune.

Na ocorrência de alergia predomina a resposta imune local do tipo TH2 sobre a TH1. A resposta TH2 aumenta a secreção de interleucinas IL4 e IL5, induzindo a diferenciação dos linfócitos B e recrutando eosinófilos. A flora bacteriana intestinal pode promover melhor balanço entre as respostas TH2 e TH1, diminuindo a intensidade da reação IgE mediada e aumentando, em contrapartida, a ativação de células B e produção de interleucinas IL6, IL12 e interferon (IFN).¹⁷

As bactérias componentes da microbiota podem igualmente atuar no reconhecimento, captação e degradação dos antígenos, modulando dessa forma a resposta inflamatória alérgica. Lactentes com redução dos microrganismos intestinais são mais propensos a desenvolver sensibilização alérgica do trato digestivo. Alguns dados são interessantes quanto à composição da microflora intestinal de lactentes atópicos e não atópicos. Nestes últimos predominam os lactobacilos, enquanto nos atópicos prevalecem as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* e *Clostridium sp.*, sobrepujando *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. A redução proporcional das bifidobactérias diminui a capacidade de neutralizar as proteínas antigênicas.^{18,19}

FLORA BACTERIANA E ANTIBIÓTICOS

A supressão da flora normal determinada pelos antibióticos pode determinar colo-

nização e supercrescimento bacteriano de patógenos. Esse efeito é notoriamente observado em muitos pacientes adultos e pediátricos, que apresentam diarreias quando da utilização de antimicrobianos. Nestes casos, tem sido detectada a multiplicação de cepas do *Clostridium difficile*, que passam a produzir citotoxinas, determinando quadros graves de colite.²⁰

O emprego de ampicilinas para o tratamento das afecções respiratórias pode determinar supressão importante tanto da flora aeróbica quanto da anaeróbica, incluindo-se *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, com consequente supercrescimento de *Klebsiella*, *Proteus* e *Candida sp.*, aumentando o risco de ocorrência de translocação dos referidos microrganismos.²¹ Há, entretanto, especialmente em pacientes neutropênicos, situações em que o emprego de antibiótico é útil, reduzindo as taxas de infecção por gram-negativos.

SUPERCREScimento BACTERIANO

Nos pacientes com transtornos anatômicos e cirúrgicos do trato digestório, há em muitos casos alteração no livre trânsito intestinal e retardo no esvaziamento gástrico. Nestas circunstâncias é comum a ocorrência de supercrescimento bacteriano, tanto aeróbico quanto anaeróbico. A redução da acidez gástrica e o aumento da concentração de bactérias de 10^7 para 10^{11} CFU/ml

determinam com frequência diarreia crônica, má absorção de nutrientes, esteatorreia e deficiência de vitamina B12. A desconjugação de sais biliares e a produção de ácidos graxos voláteis, aminas e outras substâncias osmolares perpetuam o quadro diarreico. Há, igualmente, tendência para ocorrência de acidose metabólica devido ao aumento da produção de ácido láctico e hipoproteïnemia, decorrente da maior excreção do nitrogênio fecal.²²

SPRUETROPICAL

O processo é decorrente de surtos diarreicos repetitivos, supercolonização do delgado e consequente má absorção de macro e micronutrientes. A flora fecal está alterada, com predomínio de aeróbios sobre anaeróbios, destacando-se a importante colonização por enterobactérias. Os coliformes enterogênicos são os responsáveis pela perpetuação do quadro diarreico. As biópsias de intestino delgado nessas circunstâncias demonstram importantes repercussões sobre o epitélio intestinal, que invariavelmente apresenta-se atrófico e exibe perda da arquitetura vilositária.²³

PROBIÓTICOS

Os probióticos são microrganismos não patogênicos que resistem à digestão normal e têm a capacidade de chegar vivos ao colo, onde devem exercer funções biológicas que alteram positi-

vamente a saúde do hospedeiro. Para tal, os probióticos pertencem à flora intestinal transitória e devem ser ingeridos em quantidades satisfatórias, sendo os principais gêneros o *Lactobacillus*, o *Bifidobacterium* e o *Streptococcus*. Dentre as leveduras, o *Saccharomyces boulardii* é igualmente considerado como um probiótico.²⁴

Citações do *Velho Testamento* (Gênesis 18:8) já relacionavam a longevidade de algumas pessoas com o ato de consumir leite fermentado. Em 1908, o cientista russo Elie Metchnikoff detecta que a ingestão de *Lactobacilli* contidos em iogurtes tinha a propriedade de diminuir a produção de toxinas bacterianas no intestino humano.²⁵

Tabela 2 - **Crítérios para um microrganismo ser classificado como probiótico**

Origem humana
Propriedades não patogênicas
Resistência aos processos tecnológicos (viabilidade dos veículos de entrega)
Estabilidade em meio ácido e bile
Adesão ao tecido epitelial intestinal
Capacidade de colonizar o trato digestivo por um curto espaço de tempo
Produção de substâncias antimicrobianas
Modulação da resposta imune

Os probióticos são considerados seguros para uso clínico rotineiro. Entretanto, em situações específicas, como recém-nascidos prematuros, pacientes imunodeprimidos e aqueles portadores de alterações anatômicas do trato digestório, o FDA (Food Drug Administration), até o momento, ainda não liberou seu uso. Há um potencial risco de ocorrência de bacteremia, porém os ensaios clínicos apontam para segurança ao utilizá-los.²⁶ Os lactobacilos e bifidobactérias exercem ação no colo, produzindo maiores quantidades de lactato, acetato e reduzem o pH intraluminal, propriedades

que teoricamente protegem contra a ação de bactérias patogênicas. Porém, os ensaios randomizados controlados com *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* GG e *Bifidobacterium lactis* mostram efeito modesto dos probióticos na prevenção de ocorrência de surtos de diarreia adquirida na comunidade.²⁷ O *Lactobacillus casei* GG confere proteção igualmente discreta contra as diarreias (1 entre 7 a 15 casos) e infecções respiratórias (1 entre 30 casos) em crianças hospitalizadas. Saran et al. (2002)²⁸ demonstraram em estudos comunitários realizados em ambientes insalubres na Índia que lactentes ali-

mentados com leite fermentado pelo período de 6 meses apresentaram ganho de peso maior e redução significativa de ocorrência de diarreias agudas. Em outro estudo comunitário indiano mais recente, realizado em favelas, Sur et al. (2010)²⁹ demonstraram efeito positivo na redução de doença diarreica em crianças entre 1 e 5 anos que receberam suplemento alimentar contendo cepas de *Lactobacillus casei* variedade Shirota.

O *Saccharomyces boulardii* é um fungo com ação probiótica que tem a propriedade de inibir no intestino o crescimento de bactérias patogênicas. Ele resiste à digestão ácida e alcança o colo ainda viável, porém sua ação é igualmente de curta duração. Os estudos atuais apontam para benefícios na prevenção da diarreia associados ao uso de antibióticos quando da utilização desse probiótico.^{30,31}

PROBIÓTICOS E PROMOÇÃO DA SAÚDE

Há vários estudos em curso que demonstram a interação dos probióticos com o sistema imune do hospedeiro. O efeito principal parece ser o aumento de secreção de IgA, tanto em modelos experimentais quanto em humanos. A IgA secretora intestinal tem a capacidade de ligar-se aos diferentes antígenos e prevenir danos à célula epitelial. Algumas pesquisas demonstraram que doses de *L. casei* e *L. acidophilus* aumentam a produção de IgA pelas células

plasmáticas; entretanto, as ações sobre a resposta celular imune e produção de citocinas são inconstantes e necessitam de estudos futuros para sua aplicação na prática médica.³² Estudo em prematuros demonstrou vários efeitos benéficos, tais como; aumento da produção e excreção fecal de IgA secretora, diminuição do pH fecal, por aumento de produção de acetato e diminuição da calpropectina fecal conferindo efeito protetor sobre a mucosa colônica no grupo que recebeu suplementação com *Bifidobacterium lactis*.³³

Estudos experimentais demonstraram ação dos probióticos aumentando a capacidade fagocítica. Spanhaak et al. (1998)³⁴, estudando humanos voluntários, não comprovaram alterações sobre a resposta imune, fagocitose e produção de citocinas quando confrontaram *L. casei* versus placebo. O *L. reuteri* ingerido regularmente diminui a produção de fator de necrose tumoral (TNF) e inibe a adesividade de bactérias, fungos e protozoários patogênicos.³⁵ O *Saccharomyces boulardii* promove aumento de secreção de IgA e IL-10, podendo junto com outras cepas ser utilizado na prevenção ou atenuação de processos inflamatórios. Muitos estudos atualmente estão em curso, e outros em delineamento, devendo nos próximos anos balizar a utilização dos probióticos nas diferentes patologias intestinais ou extraintestinais relacionadas ao sistema imune.³⁶

Quanto à doença diarreica, os probióticos, ao melhorar a resposta imune

tecidual, competir com os sítios de adesão dos enteropatógenos e produzir bacteriocinas, podem teoricamente exercer ação benéfica. O *Lactobacillus* GG demonstrou ser efetivo quanto ao curso das diarreias por rotavírus de crianças hospitalizadas, encurtando em 24 horas a duração do processo diarreico. Há o aumento da produção de mucina intestinal e anticorpo IgA antirrotavírus. A ação dos probióticos parece mais dirigida contra as diarreias virais, sendo pouco eficiente diante das infecções por enterobactérias.³⁷

Johnston et al.³¹ realizaram ampla revisão sistemática na base de dados Cochrane, enfatizando que, para crianças que vivem em condições salutaras, não há evidências suficientes para recomendar o uso rotineiro de probióticos na prevenção de doença diarreica aguda. No tratamento da doença diarreica aguda, os resultados são positivos em algumas circunstâncias, alcançando o efeito máximo de reduzir em 1 dia o curso evolutivo do quadro em questão, dependendo do tipo de probiótico, época e dose utilizada.¹¹ Alguns estudos demonstraram efeito positivo da suplementação de fórmulas infantis com *Bifidobacterium lactis* (individualmente ou em combinação com outra cepa) na redução do risco de infecções gastrintestinais não específicas.³⁸

Os probióticos não demonstraram resultados efetivos contra as infecções pelo *Helicobacter pylori*, tanto na erradicação quanto na fase de manutenção.³⁹ Estudos efetivados em

síndrome do colo irritável e constipação intestinal crônica igualmente não apontaram até o momento para uma ação consistente.⁴⁰

Alguns estudos em unidades neonatais demonstram efeito positivo de cepas de probióticos na prevenção de ocorrência de enterocolite necrotizante (ECN) em prematuros, ação provavelmente correlacionada com a promoção do aumento da motilidade do trato gastrointestinal.⁴¹ Estudo recente, publicado por Indrio et al. (2011), demonstra que o *L. reuteri* acelera o esvaziamento gástrico de neonatos e lactentes.⁴²

Uma metanálise realizada por Wang et al (2012) demonstrou redução no risco de e enterocolite necrozante e de mortalidade em recém nascidos de muito baixo peso com o uso de probióticos.⁴³ Os estudos igualmente não detectaram maior risco de ocorrência de sepsis nos prematuros que receberam probióticos. Dois estudos recentes envolvendo lactentes menores de 6 meses em aleitamento natural ou predominante apontam para redução significativa no tempo de choro decorrente de cólicas nos grupos que receberam o *L.reuteri* DSM 17938 por 3 ou 4 semanas quando comparado com placebo. Não houve diferenças em relação ao número e consistencia das evacuações, número de regurgitações, ganho de peso ou ocorrência de constipação.^{44,45}

Os probióticos, devido às interações com o sistema imune, têm sido muito utilizados na indução e manutenção de remissão de adultos e crianças porta-

dores de doença de Crohn e retocolite ulcerativa. Os dados relativos à doença de Crohn não demonstraram resultados satisfatórios quando comparados com grupos de controle. Porém, há efeitos positivos na prevenção de ocorrência de pouchite pós-operatória.⁴⁶ Em relação à retocolite, uma mistura concentrada de 7 cepas “VSL#3” foi eficaz como indutora e mantenedora de remissão.⁴⁷

Alguns estudos experimentais em ratos comprovaram ação benéfica de bifidobactérias sobre as taxas de colesterol LDL e HDL. O efeito parece decorrer da ação de uma hidrolase bacteriana, que promove a precipitação do colesterol com os ácidos biliares livres, aumentando o *pool* de excreção dos mesmos e contribuindo para a redução da concentração do colesterol plasmático.⁴⁸

PREBIÓTICOS

Gibson (1995) definiu como prebiótico uma substância proveniente de fonte alimentar não digerível no intestino delgado, fermentável no colo, onde exerce ações benéficas à saúde do hospedeiro. O efeito mais importante consiste no incremento da atividade metabólica e na multiplicação de microrganismos bacterianos componentes normais da microflora.⁴⁹

Os prebióticos mais conhecidos são os galacto-oligossacarídeos (GOS) e os fruto-oligossacarídeos (FOS). Os GOS são oligossacarídeos de cadeia curta derivados da hidrólise da lactose e

fermentados em nível de ceco e colo. O leite humano contém ótimas quantidades de GOS, cuja fermentação auxilia a multiplicação de lactobacilos e bifidobactérias. Os FOS são oligossacarídeos de cadeia longa ou curta cuja ação fermentativa ocorre ao longo de todo o colo. As fontes naturais são os alimentos vegetais, tais como alcachofra, alho-poró, chicória, trigo e banana. Os prebióticos autorizados para utilização em fórmulas infantis são a mistura GOS/FOS, na relação 9:1 e em quantidade máxima de 8g/l. Esta mistura em fórmulas infantis apresenta resultados positivos quanto à composição da microbiota intestinal, assemelhando-se àquela determinada pelo aleitamento natural⁵⁰. Esta mistura também mostrou-se eficaz na melhora da consistência das fezes e da frequência de evacuações, tanto quando utilizada na quantidade 0,4g/dL como 0,8g/dL. Sabe-se, portanto, que o efeito é dose-dependente e existe uma preocupação com relação ao uso de maiores quantidades, mesmo dentro do que é permitido, devido à indução de fezes líquidas, podendo aumentar o risco de desidratação em alguns lactentes, particularmente naqueles que se encontram nos primeiros meses de vida, com imaturidade renal e pouca habilidade para concentrar a urina devido a algum estresse adicional, como febre, problemas respiratórias, diarreia infecciosa, dieta com alta carga de soluto renal, ou recusa para aceitar quantidades apropriadas de líquidos.⁵¹ Estudo realizado em lactentes com ida-

de média de 7 semanas, com fórmula com 0,8g/dL demonstrou fezes aquosas ou líquidas em 27% dos casos *versus* 12% no grupo controle que recebeu fórmula regular. Embora fezes com baixa consistência sejam comuns em lactentes em aleitamento materno, deve se lembrar que o leite humano possui uma carga de soluto renal bem mais baixa do que a das fórmulas infantis.⁵²

Tabela 3 - Critérios para classificar um ingrediente alimentar como prebiótico⁴⁹

O prebiótico deve:
1 - Não ser hidrolisado ou absorvido no trato digestivo superior
2 - Ser um substrato seletivo para uma ou mais bactérias comensais normais do intestino grosso, estimulando o metabolismo ou a multiplicação das bactérias comensais
3 - Alterar o microambiente colônico, tornando-o favorável ao hospedeiro
4 - Induzir um efeito intraluminal ou sistêmico positivo para o estado de saúde do hospedeiro

Os oligossacarídeos prebióticos, adicionados às fórmulas infantis, além de exercerem ação benéfica quanto à consistência e frequência evacuatórias de lactentes, pode aumentar a produção de IgA nas fezes. Em estudo comunitário em crianças entre 1 e 3 anos de idade, adicionando-se ao leite uma mistura de prebióticos GOS/FOS e *B. lactis*, demonstrou-se efeito discreto na redução de ocorrência de diarreia aguda, porém consistente em relação aos casos de disenteria.⁵² Não existem evidências de outros benefícios da adição de prebióticos em fórmulas infantis, como prevenção de alergia e maior resistência às infecções. São, ainda necessários mais estudos para o uso rotineiro de prebióticos em recém-nascidos prematuros e lactentes em condições específicas como imunodeficiência.⁵¹

Os prebióticos influenciam a biodisponibilidade de alguns minerais, tais como cálcio, magnésio e ferro. Ao promoverem uma melhor taxa de fermentação dos ácidos graxos de cadeia curta, diminuem o pH intraluminal, otimizando a absorção dos minerais e oligoelementos. Entretanto, o impacto dos prebióticos sobre a osteoporose é reduzido, tendo-se em vista outros aspectos metabólicos mais relevantes.⁵³ Uma meta-análise publicada por Brighenti (2007)⁵⁴ levanta os dados a respeito do impacto da adição de prebióticos sobre o metabolismo lipídico, constatando efeito positivo da inulina em reduzir em 7,5% a taxa sérica dos triglicérides. O mesmo, porém, não ocorre quando se observa o nível de

colesterol total. De fato, a adição de prebióticos em fórmulas infantis não apontou para benefícios quanto aos níveis de colesterol total e fração LDL quando se compara com o aferido em lactentes que receberam fórmula *standard*⁵⁵.

Há estudos que apontam efeito positivo de inulina e fruto-oligossacarídeos utilizados em pacientes adultos com colesterol basal elevado, o que foi demonstrado através do aumento da excreção fecal de gordura e redução da lipogênese. Mulheres adultas que recebem inulina em concentrações de 14 g/dia apresentam com frequência sintomas digestivos, como flatulência, distensão abdominal gasosa e cólicas. Entretanto, outros estudos realizados em pacientes com constipação intestinal demonstram efeito laxativo positivo.⁵⁶

SIMBIÓTICOS

Sugerido por Gibson⁴⁹, o efeito probiótico associado ao prebiótico poderia ser considerado como “simbiótico” quando da mistura dos dois componentes observa-se um efeito adicional benéfico, estabelecendo assim um sinergismo favorável ao estado de saúde. Novas e possíveis associações desses componentes estão sendo testadas, abrindo para o futuro perspectivas que possam ser testadas e aprovadas.

CONCLUSÕES

A microbiota intestinal bem constituída e equilibrada exerce efeito positivo sobre a saúde humana. O leite materno contém probióticos e prebióticos, importantes para o desenvolvimento de uma flora intestinal adequada. O fornecimento de prebióticos tem demonstrado efeitos benéficos ao lactente, uma vez que proporciona uma microbiota protetora, com predominância de bifidobactérias.⁵¹ Quando da impossibilidade do aleitamento natural, a adição de oligossacarídeos nas fórmulas tem demonstrado efeitos benéficos para os lactentes. Não há evidências até o momento para a utilização corriqueira de probióticos nos casos de diarreia aguda em crianças hígdas, porém destacam-se alguns benefícios na prevenção de ocorrência de infecções, especialmente naquelas que frequentam creches ou vivem em condições ambientais desfavoráveis. Novos estudos devem fornecer subsídios em relação à diminuição das cólicas do lactente e diminuição da necessidade de utilização de antibióticos.³⁸ São ainda necessários mais estudos randomizados controlados, com diferentes cepas, doses e misturas de probióticos, que forneçam subsídios para a utilização dos mesmos no tratamento das diversas afecções gastroenterológicas.¹¹ Salienta-se entretanto, que o seu uso deve ser considerado seguro para lactentes e crianças saudáveis.

Referências bibliográficas

- Simon G, Gorbach S. The human intestine microflora. *Dig Dis Sci*. 1986;31:147S-162S.
- Shanahan F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002;16:915-31.
- Backhed F, Ley RE, Sonnemburg JL et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915-20.
- Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30:61-67.
- Long S, Swenson R. Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *J Pediatr*. 1977;91:298-301.
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30:61-7.
- Mata L, Mejicanos M, Jimenez F. Studies in the indigenous gastrointestinal flora of Guatemalan children. *Am J Clin Nutr*. 192;25:1380-90.
- Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:313-23.
- Simon G, Gorbach S. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*. 1984;86:174-193.
- Ahrne S, Nobaek S, Jeppsson B et al. The normal lactobacillus flora of healthy human oral and rectal mucosa. *J Appl Microbiol*. 1998;85:88-94.
- Vandenplas Y, Veereman-Wauters G, De Greef E et al. Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(4):292-300.
- Rolfe R. Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence of the host. *Rev Inf Dis*. 1984;67:S59-S73.
- Batt R, Rutgers G, Sanca KA. Enteric bacteria: friend or foe? *J Small Animal Prac*. 1996;37:261-67.
- D'Amico R, Pifferi S, Leonetti C, et al. Effectiveness of antibiotic prophylaxis in critically ill adults patients: systematic review of randomized controlled trials. *BMJ*. 1998;316:1275-1285.
- du Moulin G, Hedley-Whyte J, Paterson D, Libon A. Aspiration of gastric bacteria in antacid treated patients: a frequent cause of postoperative colonization of the airway. *Lancet*. 1982;1:242-45.
- Tryba M. Role of acid suppressants in intensive care medicine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001;15:447-61.
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, et al. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:2789-2883.
- He F, Ouwehand AC, Isolauri E, et al. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001;30:43-7.
- Kalliomaki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3:15-20.
- Elmer GW, McFarland LV, Surawicz CM, Danko L, Greenberg RN. Behaviour of *Saccharomyces boulardii* in recurrent *Clostridium difficile* disease patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:1663-8.
- Akita H. The change in intestinal flora by administration of antibiotics. *Jpn J Infect Dis*. 1982;56:1216-24.
- Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*. 2004;126:1620-33.
- McCracken VJ, Lorenz RG. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiol*. 2001;3:1-11.
- Thomas DW, Greer FR; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics*. 2010;126:1217-31.

25. Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr.* 2000;130:384S-390S.
26. Venugopalan V, Shriner KA, Wong-Beringer A. Regulatory oversight and safety of probiotic use. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1661-5.
27. Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, Guandalini S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42:454-75.
28. Saran S, Gopalan S, Krishna TP. Use of fermented foods to combat stunting and failure to thrive. *Nutrition.* 2002;18:393-6.
29. Sur D, Manna B, Niyogi SK, Ramamurthy T, Palit A, Nomoto K, et al. Role of probiotic in preventing acute diarrhoea in children: a community-based, randomized, double-blind placebo-controlled field trial in an urban slum. *Epidemiol Infect.* 2010;30:1-8.
30. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ.* 2002;324:1361.
31. Johnston BC, Supina AL, Ospina M, Vohra S. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;CD004827.
32. Marin ML, Tejada-Simon MV, Lee JH, et al. Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus*: comparison with *Bifidobacterium* sp and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Food Prot.* 1998;61:859-64.
33. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Mueller M, Radke M, Blaut M. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatr Res.* 2008 Oct;64(4):418-22.
34. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr.* 1998;52:1-9.
35. Jones SE, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol.* 2009;9:35.
36. Lin YP, Thibodeaux CH, Peña JA et al. Probiotic *Lactobacillus reuteri* suppress proinflammatory cytokines via-cJun. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:1068-1083.
37. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2002;109:678-84.
38. Hania S. Supplementation of Infant Formula with probiotics/prebiotics. Lessons learned with regards to documenting outcomes. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46:S67-S68.
39. Mourad-Baars P, Hussey S, Jones NL. Helicobacter pylori infection and childhood. *Helicobacter.* 2010 Sep;15 Suppl 1:53-9.
40. Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Palumeri E, Calabrese R, Oggero R, et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics.* 2010;126:e526-33.
41. Alfaleh K, Anabrees J, Bassler D. Probiotics reduce the risk of necrotizing enterocolitis in preterm infants: a meta-analysis. *Neonatology.* 2010;97:93-9.
42. Indrio F, Riezzo G, Raimondi F, Bisceglia M, Filannino A, Cavallo L, et al. *Lactobacillus reuteri* accelerates gastric emptying and improves regurgitation in infants. *Eur J Clin Invest.* 2011;41:417-22.
43. Wang Q, Dong J, Zhu Y. Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials. *Journal of Pediatric Surgery.* 2012;47:241-248.
44. Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Palumeri E, Calabrese R, Oggero R, Roos S, Matteuzzi D. *L. reuteri* DSM 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics.* 2010;126(3):e526-33.
45. Szajewska H, Gyrczuk E, Horvath A. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the management of infantile colic in breastfed infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Pediatr.* 2013 Feb;162(2):257-62.
46. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Sacharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 2000;45:1462-64.
47. Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:437-43.

48. De Roos N, Kattan MB. Effect of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:405-11.
49. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-12.
50. Scholtens PA, Alliet P, Raes M, Alles MS, Kroes H, Boehm G, et al. Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides. *J Nutr.* 2008;138:1141-7.
51. Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, Puntis JW, Rigo J, Shamir R, Szajewska H, and Turck D. Prebiotic oligosaccharides in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2004 v. 39(5):465-473.
52. SCF (2001b) *Statement on the use of resistant short chain carbohydrates (oligofructose and oligogalactose) in infant formulae and in follow-on formula.* Report No. SCF/CS/NUT/IF/35 Final.
53. Sazawal S, Dhingra U, Hiremath G, Sarkar A, Dhingra P, Dutta A, et al. Prebiotic and probiotic fortified milk in prevention of morbidities among children: community-based, randomized, double-blind, controlled trial. *PLoS One.* 2010;5:e12164.
54. Sholz-Ahrens KE, Schaafsma G, van den Heuvel EGHM, Schrezenenmeir J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2001;3:459S-464S.
55. Brighenti F. Dietary fructans and serum triacylglycerols: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Nutr.* 2007;137(11Suppl):2552S-2556S.
56. Alliet P, Scholtens P, Raes M et al. Effect of prebiotic galacto-oligosaccharide, long-chain fructo-oligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. *Nutrition.* 2007;23:710-23.
57. Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology.* 1995;108:975-82.

Nestlé Nutrition Institute

Nota importante:

O aleitamento materno é a melhor opção para a alimentação do lactente proporcionando não somente benefícios nutricionais e de proteção, como também afetivos. É fundamental que a gestante e a nutriz tenham uma alimentação equilibrada durante a gestação e amamentação. O aleitamento materno deve ser exclusivo até o sexto mês e a partir desse momento deve-se iniciar a alimentação complementar mantendo o aleitamento materno até os 2 anos de idade ou mais. O uso de mamadeiras, bicos e chupetas deve ser desencorajado, pois pode prejudicar o aleitamento materno e dificultar o retorno à amamentação. No caso de utilização de outros alimentos ou substitutos de leite materno, devem-se seguir rigorosamente as instruções de preparo para garantir a adequada higienização de utensílios e objetos utilizados pelo lactente, para evitar prejuízos à saúde. A mãe deve estar ciente das implicações econômicas e sociais do não aleitamento ao seio. Para uma alimentação exclusiva com mamadeira será necessária mais de uma lata de produto por semana, aumentando os custos no orçamento familiar. Deve-se lembrar à mãe que o leite materno não é somente o melhor, mas também o mais econômico alimento para o bebê. A saúde do lactente pode ser prejudicada quando alimentos artificiais são utilizados desnecessária ou inadequadamente. É importante que a família tenha uma alimentação equilibrada e que, no momento da introdução de alimentos complementares na dieta da criança ou lactente, respeitem-se os hábitos culturais e que a criança seja orientada a ter escolhas alimentares saudáveis.

Em conformidade com a Lei 11.265/06; Resolução ANVISA nº 222/02; OMS - Código Internacional de Comercialização de Substitutos do Leite Materno (Resolução WHA 34:22, maio de 1981); e Portaria M.S. nº 2.051 de 08 de novembro de 2001.

MATERIAL DESTINADO EXCLUSIVAMENTE AO PROFISSIONAL DE SAÚDE. PROIBIDA A DISTRIBUIÇÃO AOS CONSUMIDORES.