UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Evolução da colonização da microbiota fecal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia

Luana do Nascimento Moreira

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profª. Drª. Carla Taddei de Castro Neves

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Evolução da colonização da microbiota fecal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia

Luana do Nascimento Moreira

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profª. Drª. Carla Taddei de Castro Neves

Versão corrigida da Dissertação conforme
Resolução CoPGr 6018, de 13/10/2011

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Moreira, Luana do Nascimento

M835e Evolução da colonização da microbiota fecal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia / Luana do Nascimento Moreira. - São Paulo, 2019.

66 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Taddei, Carla R

1. Microbiota. 2. Prematuridade. 3. Recém-nascido. 4. Colostroterapia. 5. 16S rRNA. I. T. II. Taddei, Carla R, orientador.

Luana do Nascimento Moreira

Evolução da colonização da microbiota fecal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia

Comissão Julgadora da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profª. Drª. Carla Taddei de Castro Neves

orientador/presidente

_____

1°. examinador

_____

2°. examinador

_____

3°. examinador

_____

4°. examinador

São Paulo, 24 de Outubro de 2019.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade em realizar meu projeto de mestrado.

À Profa. Dra. Carla Taddei, pela oportunidade em fazer parte de sua equipe, por me orientar e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Sandro R. Almeida, coordenador do programa de pós-graduação em farmácia (fisiopatologia e toxicologia), por todo o apoio oferecido para o desenvolvimento deste estudo.

À Dra. Andrea S. Fernandes, coordenadora do Banco de Leite Humano do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, pelo convite em realizar este estudo.

Ao Dr. Corintio M. Neto, diretor técnico de saúde do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, pela anuência em realizar o estudo e à todos os funcionários do Hospital que nos ajudaram na realização.

Ao Prof. Dr. Rubéns Feferbaum, pela orientação fornecida desde o desenho do estudo até as conclusões aqui apresentadas.

Ao Prof. Dr. Jorge L. M. Sampaio, por sempre ter as portas de seu laboratório abertas para que eu pudesse utilizar seus equipamentos, além de diversas vezes em que me solucionou duvidas.

À técnica do laboratório de microbiologia, Fabiana Teixeira, por inúmeras vezes em que me ajudou, sempre sorrindo e descontraída.

Aos funcionários do Laboratório Clínico do Hospital Universitário, pelas duvidas solucionadas em diversos momentos e pelos inúmeros cafés cheios de descontrações ao longo destes anos.

Aos meus colegas de laboratório, Amanda, Cilícia, Gustavo e Ramon, por todo o companheirismo construído ao longo do tempo.

RESUMO

MOREIRA, L. N. Evolução da colonização da microbiota fecal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia. 2019. 66f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A amamentação tem um papel importante no desenvolvimento neonatal e no estabelecimento da microbiota intestinal. Neste contexto, a administração orofaríngea de colostro, ou colostroterapia, torna-se uma prática importante para o desenvolvimento do recém-nascido prematuro, auxiliando na maturação do trato gastrintestinal, na introdução precoce do leite materno e pode ser capaz de proteger o bebê contra bactérias patogênicas. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar o estabelecimento da microbiota intestinal em recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia. O estudo contou com a inclusão de 33 recém-nascidos prematuros internados na unidade de terapia intensiva neonatal do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, em São Paulo. Os recém-nascidos foram divididos em quatro grupos, de acordo com o regime de colostroterapia e dieta, a saber: colostroterapia exclusiva com colostro cru (CCE, n=7), colostroterapia exclusiva com colostro pasteurizado (CPE, n=9), colostroterapia com colostro pasteurizado e dieta prevalente de colostro pasteurizado (CPC, n=10) e colostroterapia com colostro pasteurizado e dieta prevalente de leite humano pasteurizado (CPP, n=7). Foram coletadas amostras de fezes semanalmente durante os primeiros 22 dias de vida do bebê, e a microbiota intestinal foi caracterizada por sequenciamento da região V4 do gene *16S rRNA* e análises de PCR em tempo real. Entre os grupos de CCE e CPE nota-se que existe diferença na comunidade bacteriana através das análises de abundância relativa da microbiota. Porém, a abundância de gêneros potencialmente patogênicos está aumentada nos grupos CPC e CPP. A presença de bifidobactérias e aumento contínuo ao longo dos primeiros dias de vida no grupo CPE e CPP, é um resultado que pode ser utilizado para reforçar o uso do leite pasteurizado na ausência do leite fresco, mostrando que o mesmo pode favorecer a prevalência de gêneros benéficos para a microbiota intestinal. Neste estudo, além de compararmos a modulação do colostro cru e pasteurizado na microbiota intestinal do bebê a partir da colostroterapia exclusiva, pudemos mostrar que o colostro pasteurizado desempenha um papel diferente que o leite humano pasteurizado na microbiota intestinal.

Palavras-chave: microbiota intestinal, prematuridade, recém-nascido, colostroterapia, *16S rRNA*.

ABSTRACT

MOREIRA, L. N. Evolution of fecal microbiota colonization in preterm infants submitted to colostrum therapy. 2019. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Breastfeeding plays an important role in neonatal development and establishment of the intestinal microbiota. In this context, oropharyngeal administration of colostrum, or colostrum therapy, becomes an important practice for the development of preterm infant, assisting in maturation of the gastrointestinal tract, early introduction of breast milk and may be able to protect the baby against pathogenic bacteria. Thus, the aim of the present study was to evaluate the establishment of the intestinal microbiota in preterm infants submitted to colostrum therapy. The study included 33 preterm infants admitted to the neonatal intensive care unit of the Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, in São Paulo. The newborns were divided into four groups according to the colostrum therapy and diet regimen: exclusive colostrum therapy with raw colostrum (CCE, n = 7), exclusive colostrum therapy with pasteurized colostrum (CPE, n = 9), colostrum therapy with pasteurized colostrum and pasteurized colostrum diet (CPC, n = 10) and colostrum therapy with pasteurized colostrum and pasteurized human milk diet (CPP, n = 7). Stool samples were collected weekly during the first 22 days of the baby's life, and the intestinal microbiota was characterized by sequencing the V4 region of the *16S rRNA* gene and real-time PCR analysis. Between the CCE and CPE groups, there is a difference in the bacterial community through the microbiota relative abundance analysis. However, the abundance of potentially pathogenic genera is increased in the CPC and CPP groups. The presence of bifidobacteria and continuous increase throughout the first days of life in the CPE and CPP group is a result that can be used to reinforce the use of pasteurized milk in the absence of fresh milk, showing that it may favor the prevalence of beneficial bacteria genera to the intestinal microbiota. In this study, in addition to comparing the modulation of raw and pasteurized colostrum in the baby's intestinal microbiota from exclusive colostrum therapy, we were able to show that pasteurized colostrum plays a different role than pasteurized human milk in the intestinal microbiota of preterm infant.

Keywords: gut microbiota, prematurity, newborn, colostrum therapy, *16S rRNA*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Barreira intestinal 13

Figura 2 PCoA com base na matriz de distância UniFrac para os grupos 40

Figura 3 PCoA com base nas distancias da UniFrac para as amostras 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições para os ensaios de real time PCR 27

Tabela 2 Dados clínicos dos recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia 29

Tabela 3 Dados sobre dieta predominante ao longo do tempo 30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Ganho de peso ao longo do tempo em recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia 31

Gráfico 2 Abundância relativa de filos bacterianos na microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia 32

Gráfico 3 Heatmap para filos bacterianos 33

Gráfico 4 Abundância relativa de gêneros bacterianos na microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia 35

Gráfico 5 Heatmap para gêneros bacterianos 37

Gráfico 6 Índices de alfa diversidade Simpson, Shannon e Chao 1 39

Gráfico 7 Quantificação bacteriana por real time PCR na microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia 43

LISTA DE ABREVIAÇÕES

DNA	Ácido desoxirribonucléico
g	Grama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kg	Quilograma
mL	Mililitros
QIIME	*Quantitative Insights Into Microbial Ecology rRNA*
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 12

1.1 Microbiota intestinal humana 12

1.2 Microbiota intestinal no início da vida e infância 14

1.3 Recém-nascido prematuro 16

1.4 Amamentação e saúde neonatal 17

1.5 O leite humano pasteurizado 19

1.5 Colostroterapia 19

2. JUSTIFICATIVA..... 21

3. OBJETIVOS..... 22

3.1 Objetivos Gerais 22

3.2 Objetivos específicos 22

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 23

4.1 Colostroterapia e casuística 23

4.2 Considerações éticas 24

4.3 Coleta de amostras e extração de DNA 24

4.4 Sequenciamento da região V4 do gene *16S rRna*..... 25

4.5 Análises de bioinformática 25

4.6 Quantificação bacteriana por real time PCR 26

4.7 Análises estatísticas 27

5. RESULTADOS..... 28

5.1 Dados clínicos..... 28

5.2 Abundância relativa..... 31

5.3 Análises de alfa diversidade..... 37

5.4 Análises de beta diversidade..... 39

5.5 Quantificação bacteriana..... 42

6. DISCUSSÃO..... 44

7. CONCLUSÕES..... 51

REFERÊNCIAS..... 53

ANEXOS..... 61

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo 61

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros 64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota intestinal humana

A microbiota intestinal humana é construída e modulada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos do hospedeiro. A composição da microbiota materna, o tipo de parto, uso de medicamentos e interações ambientais são alguns dos fatores extrínsecos que modulam o estabelecimento da microbiota, assim como os fatores intrínsecos (fisiologia, peristaltismo, resposta imunológica, entre outros) (MARTIN et al., 2016; PENDERS et al., 2006). Além destes fatores, a competição entre os microrganismos por receptores da mucosa e interações com o hospedeiro constituem um papel importante na modulação, e, consequentemente, na variabilidade interindividual da composição da microbiota (JOST et al., 2015).

Diversas funções são atribuídas à microbiota intestinal, como modulação imunológica, barreira protetora contra patógenos, absorção de nutrientes e produção de diversas moléculas (ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas, peptídeos antimicrobianos, entre outros) (JANDHYALA et al., 2015). As bactérias da microbiota possuem a capacidade de modular o sistema imunológico para que haja tolerância a estas e reconhecimento de bactérias patogênicas, resultando na inibição da proliferação e translocação de bactérias patogênicas (JANDHYALA et al., 2015). A interação entre bactérias da microbiota e células epiteliais ou imunológicas, gera constantemente reações imunológicas equilibradas que induzem a produção de interleucinas e imunoglobulinas (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015; WALKER, 2010). No recém-nascido (RN), a microbiota tem a capacidade de equilibrar a relação de fenótipos de reações helper 1 (Th1) e helper 2 (Th2), junto a produção de imunoglobulinas, diminuindo a prevalência de doenças atópicas (SCHOLTENS et al., 2012).

O metabolismo de carboidratos pela microbiota resulta em substratos que serão posteriormente absorvidos pela mucosa intestinal. Uns dos principais produtos provenientes da degradação de carboidratos são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como lactato, acetato, propionato e butirato. Estas moléculas possuem ação anti-inflamatória e antioxidante, além de estimular a diferenciação das células do epitélio

intestinal (BOTTACINI; VAN SINDEREN; VENTURA, 2017; PLAZA-DÍAZ; FONTANA; GIL, 2018). O propionato pode ser produzido por bactérias do gênero *Veillonella* e *Prevotella*, enquanto que o butirato pode ser obtido através do metabolismo de bactérias como *Roseburia* e *Eubacterium* (DUNCAN; LOUIS; FLINT, 2004; JOST et al., 2015). A conversão de lactato em butirato já foi observada quando espécies de bifidobatérias são cultivadas com outros gêneros, como *Roseburia* ou *Eubacterium* (FLINT et al., 2014). Esta conversão auxilia no equilíbrio do pH intestinal, reduzindo o excesso de lactato e conseqüentemente o excesso de acidez (DUNCAN; LOUIS; FLINT, 2004).

A barreira intestinal é composta pela lâmina própria, células do sistema imune camada de células epiteliais e uma camada de muco (Figura 1). A camada de muco é composta principalmente por glicoproteínas, as mucinas, e possui um papel fundamental na proteção contra microrganismos invasores (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015). Além do papel protetor, a camada de muco auxilia no reconhecimento de bactérias pelas células imunológicas e reprime o excesso de translocação de metabolitos e moléculas bacterianas para circulação sanguínea do hospedeiro (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015).

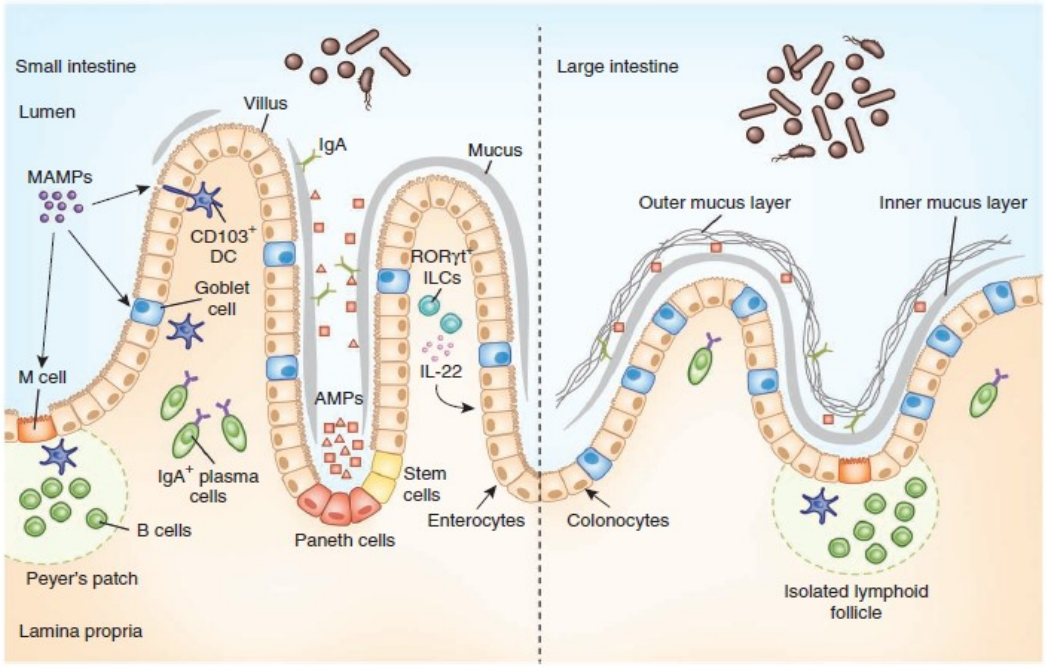


Figura 1 – Barreira intestinal (BROWN; SADARANGANI; FINLAY, 2013). MAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; IgA: imunoglobulina A; DC: células

dendríticas; AMPs: peptídeos antimicrobianos; ILCs: células linfóides inatas; IL-22: interleucina-22.

1.2 Microbiota intestinal no início da vida e infância

A presença de DNA bacteriano no líquido amniótico, placenta e no mecônio são evidências indicativas que a colonização do RN se inicia ainda na vida intra-uterina (AAGAARD et al., 2014; COLLADO et al., 2016; GOSALBES et al., 2013). Em 2016, Collado e colaboradores realizaram um estudo com o propósito de investigar esta colonização intra-utero. Os autores encontraram presença bacteriana no líquido amniótico em amostras da placenta e no mecônio de RN (COLLADO et al., 2016). Neste mesmo estudo, alguns fenótipos bacterianos encontrados no mecônio eram semelhantes aos encontrados no líquido amniótico e placenta, dados que sugerem uma colonização anterior ao parto. Especula-se que células dendríticas do intestino materno são capazes de transportar bactérias da microbiota intestinal, através da via circulatória, para o ambiente uterino, atravessando a barreira placentária (RESCIGNO et al., 2001). Um estudo com modelo animal observou que, após a inoculação de ratas prenhas com cepas de *Enterococcus faecium* marcados, o líquido amniótico e o mecônio estavam colonizados com a bactéria marcada, reforçando a teoria que o ambiente uterino pode conter bactérias da microbiota intestinal materna (JIMÉNEZ et al., 2005).

Apesar das evidências indicarem que o desenvolvimento da microbiota possa se iniciar ainda no útero, a carga bacteriana do parto possui um importante papel na colonização inicial. Desta maneira, o tipo de parto carrega grande impacto na microbiota intestinal inicial do RN, de modo que diversos trabalhos já investigaram as influências do tipo de parto e o desenvolvimento da microbiota intestinal da criança (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010; MARTIN et al., 2016). Bebês nascidos de parto normal tendem a apresentam uma microbiota mais diversa, predominantemente relacionada com a microbiota vaginal materna, enquanto RN de parto cesáreo apresentam uma microbiota associada ao ambiente, com maior abundância de bactérias encontradas na pele como *Staphylococcus* e *Propionebacterium*, sugerindo que esses bebês estão mais suscetíveis a interferências do ambiente hospitalar, apresentando uma microbiota não tão saudável como

aquela apresentada por bebês nascidos de parto normal (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010).

Após o nascimento, a dieta também terá um papel importante na colonização inicial da microbiota intestinal. Durante a amamentação ocorre a transferência de diversos gêneros bacterianos do leite materno para o trato gastrintestinal do bebê, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de oligossacarídeos que favorecem a colonização de bactérias benéficas (MURPHY et al., 2017; WANG et al., 2015). Distúrbios na vida do bebê no período entre o nascimento até os dois anos de vida, como por exemplos os relacionados à alimentação e uso de medicamentos, com consequente colonização anormal da microbiota intestinal, poderão ter um impacto significativo na vida adulta do bebê, como a manifestação de doenças atópicas e inflamatórias, como diabetes, obesidade e alergias (BÖTTCHER; JENMALM; BJÖRKSTÉN, 2003; GROER et al., 2015; RAJANI; SEPPO; JÄRVINEN, 2018).

De maneira geral, em bebês saudáveis e a termo, as bactérias anaeróbias facultativas, como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são as primeiras bactérias a se instalarem e colonizarem o trato gastrintestinal do recém-nascido, devido ao elevado teor de oxigênio que existe inicialmente. À medida que estas bactérias consomem o oxigênio, o meio se torna mais adequado para as bactérias anaeróbias estritas, como *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium* (PALMER et al., 2007). Posteriormente, a composição da microbiota se torna mais estável e a comunidade bacteriana normal do adulto é alcançada em torno do segundo ano de vida do bebê, sendo os filos *Actinobacteria*, *Bacteroides* e *Firmicutes* dominantes característicos. A partir deste período, embora a microbiota intestinal permaneça em interação constante com microrganismos do meio ambiente, sua composição se mantém estável. Alterações neste equilíbrio poderão ser observadas com o uso de antibióticos, tratamento imunossupressor e em condições patológicas que levam a uma disbiose intestinal (VANGAY et al., 2015).

A introdução de alimentos sólidos na dieta do bebê é responsável pela introdução de novos carboidratos não digeríveis, sendo um fator importante para as principais alterações observadas na composição da microbiota intestinal. Estudos mostram que a composição da microbiota intestinal muda com a introdução de alimentos sólidos, apresentando um aumento de diversidade bacteriana e prevalência de bactérias como

Bacteroides, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (FALLANI et al., 2011). Mesmo após a introdução de alimentos sólidos, as bactérias anaeróbias facultativas, como *Bifidobacterium,* continuam dominantes na microbiota, principalmente nos bebês que ainda são amamentados com leite materno, porém em menor abundância (FALLANI et al., 2011). Neste período, os componentes da dieta são fundamentais para manter o equilíbrio durante as alterações na microbiota intestinal.

1.3 Recém-nascido prematuro

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), RN com menos de 37 semanas de gestação são classificados como prematuros (RNPT). A prematuridade pode ainda ser dividida em quatro categorias: RNPT tardio entre 34 a <37 semanas, RNPT moderados entre 32 a <34 semanas, muito RNPT entre 28 a <32 semanas e o RNPT extremo com menos de 28 semanas de gestação (VOGEL et al., 2016). A prematuridade é um fator de risco importante para mortalidade e morbidade neonatal e infantil (LOFTIN et al., 2010). Segundo o Sistema de Informações Sobre Nascidos Vivos (SINASC), dados de 2017 mostram que pouco mais de 10% dos RN vivos no Brasil são prematuros, e ainda segundo o SINASC, a taxa de sobrevivência de RNPT vem aumentando ao longo do tempo.

Um dos fatores de risco para prematuridade é a idade materna. Partos prematuros possuem maior incidência em adolescentes e em gestantes com idade avançada (CAROLAN; MIDWIFERY, 2013; SMITH; PELL, 2001). A nuliparidade e histórico de gestações prematuras anteriores também podem ser fatores de risco para prematuridade, assim como gestações muito próximas, com menos de doze meses de intervalo, e gestações múltiplas (VOGEL et al., 2018). Além destes fatores, o tabagismo e uso de drogas ilícitas aumentam o risco à prematuridade (CNATTINGIUS, 2004; FREITAS et al., 2018).

O RNPT apresenta uma superfície mucosa intestinal particularmente sensível, devido à imaturidade das células do epitélio intestinal, além de imaturidade de diversos outros tecidos, levando a necessidade de um acompanhamento hospitalar do neonato após o nascimento. Neste contexto, a interação ambiental é delicada podendo acarretar algumas complicações em curto prazo, como doenças respiratórias, enterocolite necrosante (ECN), sepse neonatal tardia (SNT) e intolerância alimentar (FANARO, 2013; PLATT, 2014;

VOGEL et al., 2018). A microbiota intestinal inicial do RNPT é diferente do neonato nascido a termo e diversos estudos já evidenciaram esta diferença (DAHL et al., 2018; FORSGREN et al., 2017; PENDERS et al., 2006). A microbiota do RNPT no início da vida tende a apresentar maior abundância de bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria*, levando a um perfil de AGCC distinto, com menor concentração de acetato e maiores proporções de propionato e butirato (DAHL et al., 2018).

A SNT e a ECN são complicações comuns na prematuridade e estão associadas a altas taxas de mortalidade. A SNT é classificada como uma sepse neonatal com sinais e sintomas após 72 horas de vida. Fatores como a não amamentação, duração prolongada da nutrição parenteral plena (NPP), uso prolongado de antibióticos e outras intervenções invasivas são fatores de risco para a SNT (DONG; SPEER, 2015). Além destes fatores, o ambiente hospitalar por si próprio pode exercer influência na evolução da microbiota intestinal, que por sua vez pode ter relação com episódios de sepse neonatal.

1.4 Amamentação e saúde neonatal

O leite materno é a principal fonte de carboidratos, proteínas e imunoglobulinas, oligossacarídeos, fatores de crescimento e citocinas, entre outros componentes benéficos ao RN, incluindo bactérias (BÖTTCHER; JENMALM; BJÖRKSTÉN, 2003; CLAUD; SAVIDGE; WALKER, 2003; FROST et al., 2014; LÖNNERDAL, 2010; WANG et al., 2015). Parte da lactose e oligossacarídeos provenientes do leite materno penetram intactos no intestino, servindo de substrato para o crescimento de bactérias benéficas como os lactobacilos e bifidobactérias, através de processos fermentativos (PLAZA-DÍAZ; FONTANA; GIL, 2018). Além da função de acidificação do meio intestinal e geração dos AGCC, os oligossacarídeos são capazes de promover a modulação do sistema linfóide associado ao intestino, prevenindo a translocação bacteriana e reações alérgicas (PLAZA-DÍAZ; FONTANA; GIL, 2018).

A maturação do leite humano ocorre durante as primeiras semanas de vida do bebê, sendo divido em colostro, leite de transição e leite maduro. A concentração de cada componente, entretanto, muda ao longo da maturação do leite humano. Sabe-se que o colostro, produzido entre o primeiro e terceiro dia de lactação, possui altas concentrações

de alguns componentes, como lactoferrina, TGF-β e IgA, quando comparado ao leite maduro, tornando-se sua administração muito importante para a saúde neonatal (CASTELLOTE et al., 2011; FROST et al., 2014; TURIN et al., 2017).

Diversos estudos foram realizados com o propósito de caracterizar a composição bacteriana do leite (BIAGI et al., 2017; MURPHY et al., 2017; PANNARAJ et al., 2017). Inicialmente, acreditava-se que as bactérias do leite eram provenientes da microbiota oral dos bebês, porém, essa via de colonização não explicava à diversidade bacteriana encontrada no leite humano (FERNÁNDEZ et al., 2013). Posteriormente, o eixo entero-mamário foi proposto, onde se acredita que células dendríticas da mucosa intestinal da mãe engolfam bactérias e as levam via circulação até as glândulas mamárias, onde então são liberadas e se tornam parte da microbiota do leite (FERNÁNDEZ et al., 2013). Desta forma, a colonização do leite materno tem mais de uma via, sendo a principal o eixo enterro-mamário.

Diversos trabalhos descrevem a importância da amamentação, principalmente, em RNPT, em que o leite materno é capaz de prevenir o desenvolvimento de diversas doenças, como displasia broncopulmonar (PATEL et al., 2013) e ECN (JOHNSON et al., 2015), além de diminuir a incidência de mortalidade de RNPT (CORPELEIJN et al., 2012) e incidência de SNT em UTIN (PATEL et al., 2013). Acredita-se que o leite materno pode promover um estado de inflamação fisiológica importante para o equilíbrio e interação dos microrganismos com o epitélio intestinal (GROER et al., 2015).

A importância dos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na microbiota intestinal consiste na capacidade de inibição competitiva com outras bactérias pela adesão à mucosa intestinal e na síntese de compostos que inibem ou destroem bactérias patogênicas. Seus efeitos imuno moduladores da mucosa intestinal acarretam um aumento da atividade de células *natural-killer* e produção de macrófagos, que consequentemente promovem a secreção da IgA (PLAZA-DÍAZ; FONTANA; GIL, 2018; WALKER, 2010). Um trabalho com RNPT verificou que a administração de leite materno para o neonato diminui a permeabilidade intestinal, comparado a RNPT que recebiam fórmula infantil ou poucas doses de leite materno (TAYLOR et al., 2009). O aumento da permeabilidade intestinal possui um papel importante no desenvolvimento de doenças.

1.5 O leite humano pasteurizado

Os benefícios do leite materno são inúmeros e evidências científicas comprovam que este é o melhor alimento para o recém-nascido. Entretanto, as taxas de aleitamento materno estão abaixo do recomendado pela OMS e Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) (UNICEF, 2014). Iniciativas para promover o aleitamento materno tem sido realizadas a décadas atrás. Em 1981 foi criado o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM), com o objetivo de promover campanhas publicitárias, criar leis trabalhistas e criar grupos de apoio ao aleitamento ou materiais didáticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Dentro do programa PNIAM, uma das ações realizadas para promover o aleitamento era a criação de Bancos de Leite Humano (BLH), responsáveis pela coleta do leite, processamento e controle de qualidade, para em seguida o leite humano ser distribuído à população necessitada (SOARES et al., 2018). O leite doado que é recolhido pelo BLH, passo pelo processo de pasteurização para garantir a inativação de microrganismos, os quais são capazes, dependendo da quantidade ou qualidade, de representar risco a saúde neonatal (PEILA et al., 2016). Após o processo de pasteurização, normalmente este leite é oferecido a recém-nascidos internados em UTIN.

1.6 Colostroterapia

Mesmo diante dos benefícios do leite materno para o RNPT, o início da alimentação enteral muitas vezes é tardio, em decorrência de várias intercorrências no início da vida do neonato, como a instabilidade hemodinâmica e sinais de intolerância alimentar (CORPELEIJN et al., 2011; FANARO, 2013). Desta maneira, métodos alternativos para administração do leite humano ao RNPT têm sido investigados como administração orofaríngea de colostro (RODRIGUEZ et al., 2010), lavagem gástrica (PATEL; SHAIKH, 2007) e a higiene oral com colostro em recém-nascido sob ventilação mecânica (THIBEAU; BOUDREAUX, 2013).

A administração orofaríngea do colostro, também chamada de colostroterapia, é uma prática segura, viável e bem tolerada até mesmo pelos menores RNPT (RODRIGUEZ et al., 2010). A colostroterapia corresponde à administração de pequenas quantidades de

colostro diretamente na mucosa oral do RN com o propósito de estimular o sistema imune através de fatores imunológicos protetores presentes no colostro. Rodriguez e colaboradores, em 2015, sugeriram mecanismos benéficos pelos quais a colostroterapia poderia melhorar a saúde neonatal: interação das citocinas presentes no colostro com as células do sistema imune presentes na orofaringe; absorção de fatores bioativos pela mucosa orofaríngea; formação de uma barreira de proteção contra os patógenos; efeitos locais e sistêmicos dos oligossacarídeos presentes no colostro com modulação da microbiota intestinal e efeitos antioxidantes protetores (RODRIGUEZ et al., 2015).

As evidências preliminares defendem o efeito da colostroterapia em reduzir o tempo de chegada à alimentação enteral total e tempo de internação em RNPT (GEPHART; WELLER, 2014; SEIGEL et al., 2013). Um estudo publicado em 2017 observou menor incidência de ECN e SNT em RNPT submetidos à colostroterapia quando comparados ao grupo controle, sem administração da terapia (ZHANG et al., 2017). A prática da colostroterapia em UTIN e conscientização dos pais quanto à prática, foi capaz de aumentar o tempo de amamentação exclusiva ou preferência pelo leite materno como alimento após a alta hospitalar (SNYDER et al., 2017).

Estudos defendem que a administração orofaríngea do colostro materno desempenha efeito imunológico local e sistêmico, por estimular os tecidos linfáticos locais e ainda podendo de ser absorvido pelo tecido do trato gastrintestinal (GEPHART; WELLER, 2014). Em 2015, Lee e colaboradores estudaram os efeitos imunológicos da colostroterapia em RNPT extremos. Neste estudo, além do aumento de IgA secretora nos RNPT submetidos a colostroterapia, houve menor incidência de sepse clínica, quando não há isolamento bacteriano, no grupo submetido a colostroterapia (LEE et al., 2015). A administração orofaríngea do colostro também é capaz de aumentar a concentração de lactoferrina na saliva do RN, proteína relacionada com a proliferação de enterócitos e responsável por um ambiente intestinal menos permeável, podendo reduzir a incidência de infecções (MANZONI, 2016; ROMANO-KEELER et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Durante a internação em uma UTIN, a colostroterapia em RNPT foi capaz de alterar a microbiota oral do grupo. A avaliação da microbiota oral após 96 horas da primeira administração do colostro mostrou menor abundância de bactérias da família *Staphylococcaceae* nos neonatos submetidos à colostroterapia, comparado ao grupo

controle (SOHN et al., 2016). Bactérias pertencentes a esta família são comuns na cavidade oral de neonatos e adultos, entretanto, em RNPT, não submetidos à colostroterapia e internados em uma UTIN, esta família domina quase por completa a microbiota oral do bebê (SOHN et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Sabendo os benefícios que a colostroterapia pode oferecer ao recém-nascido prematuro e a importância do estabelecimento de uma microbiota saudável no início da vida, a caracterização da microbiota intestinal de prematuros submetidos à colostroterapia pode trazer novos resultados promissores para o entendimento dos benefícios desta prática.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o estabelecimento da microbiota fecal em recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia ao longo do primeiro mês de vida.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o estabelecimento da microbiota fecal de RNPT submetidos à colostroterapia com colostro cru da própria mãe ou colostro pasteurizado do banco de leite humano do hospital, através da metodologia do sequenciamento da região V4 do gene *16S rRNA*;

- Quantificar bactérias totais e gênero *Bifidobacterium* na microbiota fecal dos grupos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Colostroterapia e casuística

O Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros (HMLMB) é um hospital público, localizado na zona leste de São Paulo, no bairro Belenzinho, o qual tem o cuidado e a preocupação em oferecer atendimento de qualidade e humanizado à população. A unidade possui o banco de leite humano referência para a região e também é referência no atendimento a gestantes e parturientes de alto risco, prestando assistência especializada em obstetrícia, ginecologia e neonatologia. O HMLMB é destaque em ações de humanização e possui o selo Hospital Amigo da Criança desde 2000, iniciativa que promove, protege e apóia o aleitamento materno. (Secretaria do Estado de Saúde)

O HMLMB possui em sua rotina a prescrição de colostroterapia para todos os RNPT internados na UTIN. Nesta terapia, é ofertado ao RNPT o colostro materno ou colostro pasteurizado do banco de leite humano (BLH) da própria unidade. O colostro pasteurizado só é ofertado quando o colostro materno não está disponível, seja por ausência da mãe na hora da oferta ou por dificuldades na ordenha do colostro. O protocolo definido como colostroterapia no HMLMB corresponde à administração de 0,2mL de colostro cru ou pasteurizado, instilado diretamente na boca do RNPT em um período de 3/3 h. A terapia inicia-se nas primeiras 24hs de vida estendendo-se até o término da nutrição trófica, determinada como 10-15 mL/Kg de 3/3 h, o qual o período até esta proporção varia de acordo com a evolução clínica do RNPT.

O presente trabalho possui quatro grupos de estudos:

- RNPT submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral (CCE, n=7);

- RNPT submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral (CPE, n=9);

- RNPT submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado (CPC, n=10);

- RNPT submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado (CPP, n=7).

O método de pasteurização realizado no BLH do HMLMB é o Holder, o qual consiste no aquecimento do leite humano por 30 minutos a 62,5°C, sendo este o método mais comum utilizado em BLH e o mais recomendado (MORO et al., 2019).

A composição da dieta variava entre colostro pasteurizado e leite humano pasteurizado, dependendo da prescrição médica para o neonato e a disponibilidade no BLH. Além disso, quando a mãe estava presente na UTIN no momento da alimentação do RNPT era ofertado o leite fresco. Neste trabalho, a dieta predominante foi considerada aquela administrada ao neonato em volumes equivalentes a mais de 60% em comparação ao volume diário total.

4.2 Considerações éticas

O presente trabalho possui aprovação dos comitês de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CAAE: 76151717.0.0000.0067) e do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros (CAAE:76151717.0.3001.0063) (Anexos 1 e 2). Todas as mães foram auxiliadas, leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.3 Coleta de amostras e extração de DNA

Foram coletadas amostras de fezes entre os dias 1 e 3 de vida (S1), ao 7º dia de vida (S2) e ao 22º dia de vida (S3). As amostras foram coletadas diretamente da fralda do RNPT, imediatamente após a evacuação, e depositadas em tubos estéreis pelas enfermeiras da UTIN previamente orientadas. As amostras de fezes foram armazenadas em congelamento a -20°C até o envio da amostra ao Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, que ocorreu nas 24 horas seguintes à coleta. No Laboratório, as amostras foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

O DNA total das amostras de fezes foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante e armazenados em freezer -20ºC até o momento da utilização. A qualidade do DNA extraído foi analisada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop (ThermoScientific).

4.4 Sequenciamento da região V4 do gene *16S rRNA*

A caracterização da microbiota fecal foi realizada através da amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, utilizando os primers V4 *forward* (5'- TCG TCG GCA GCC AGT GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GT -3') e V4 *reverse* (5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT -3') (KOZICH et al., 2013). A amplificação inicial foi realizada em duas etapas e posteriormente foi seguido o protocolo de preparação da biblioteca de sequenciamento metagenômico 16S Illumina®. O tamanho do fragmento de PCR é de 250pb e 412pb após a indexação dos adaptadores. Foi utilizado o kit de adaptadores Nextera XT índex, kit de reagentes V2 500 ciclos e o equipamento MiSeq Illumina®.

4.5 Análises de bioinformática

O software QIIME v.1.9.1 foi utilizado para remover as sequências de *barcodes* e do *primer*, retirar artefatos quiméricos, efetuar o alinhamento das sequências, construção da matriz de distância, agrupamento das unidades operacionais taxonômicas (OTUs) e para calcular os índices de diversidade (CAPORASO et al., 2010). Após a filtragem e exclusão de sequências quiméricas, as sequências foram agrupadas em OTUs, baseando-se em similaridade de 97% contra o banco de dados SILVA versão 128 (QUAST et al., 2013). Posteriormente foram calculados os índices de alfa e beta diversidade (WHITTAKER, 1972).

A Alfa diversidade considera a composição das diferentes espécies em unidades de amostragem, ou seja, determina quais espécies foram observadas e quantos tipos diferentes de espécie estão presentes na comunidade (WHITTAKER, 1972). O índice de diversidade

de Shannon avalia a uniformidade da comunidade observada, considerando a proporção de cada espécies na comunidade em relação ao total observado (SHANNON, 1948). Dominância de Simpson é um índice influenciado pelo grau de dominância na comunidade, ou seja, avalia a probabilidade de dois indivíduos escolhidos por acaso na comunidade pertencer a mesma espécie (PYLRO et al., 2014). Análises qualitativas da alfa diversidade, como Chao 1, estimam o número total de espécies encontradas em uma determinada comunidade (CHAO, 1984).

A parir da beta diversidade, foi possível estabelecer as diferenças entre as comunidades através da realização de análises de coordenadas principais (PCoA), baseadas nas matrizes de distância filogenéticas UniFrac ponderada e não ponderada (NAVAS-MOLINA et al., 2013). Os valores de UniFrac ponderada consideram a dominância de OTUs presentes na comunidade (LOZUPONE et al., 2007), enquanto os valores não ponderados consideram a observação ou ausência de OTUs de espécies raras (LOZUPONE; KNIGHT, 2005).

A ferramenta online *Microbiome Analyst*, foi utilizada para a construção dos gráficos Heatmap apresentados no trabalho (DHARIWAL et al., 2017).

4.6 Quantificação bacteriana por real time PCR

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados no equipamento 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). As sequências para cada iniciador *foward*, *reverse*, sonda e suas devidas concentrações foram listadas na Tabela 1. Os ensaios foram realizados nas seguintes condições de temperatura: denaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. Para cada reação, foi construída uma curva padrão em diluição seriada a partir de uma concentração inicial conhecida do DNA do gênero correspondente ao iniciador. O DNA genômico foi obtido através do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

Para a quantificação de bactérias totais, o DNA de *E. coli* ATCC 25922 foi eleito para a construção da curva padrão, uma vez que o número de cópias do gene *16S rRNA* deste gênero bacteriano é conhecido (LEE; LEE; SHIN, 2008; ZHANG; SHAO; FANG,

2009). A cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb-12 foi eleita para a construção da curva padrão para o gênero *Bifidobacterium.* Os valores de cópias de DNA bacteriano por µL de DNA total foram calculados pelo próprio software do equipamento (7500 Software v2.3). Estes dados foram posteriormente ajustados para que os valores apresentados estejam em log de células equivalentes por grama de fezes (STODDARD et al., 2015).

Tabela 1 – Condições para os ensaios de real time PCR

Alvo	**Primers e sondas**	**Sequência (5' - 3')**	**Concentração (nM)**	**Referência**
Bactérias totais	F_Bact 1369	CGGTGAATACGTTCCCGG	200	(FURET et al., 2009)
	R_Prok 1492	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	200	
	P_TM1389F	6FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC	250	
Bifidobacterium spp.	F_Bifid 09c	CGGGTGAGTAATGCGTGACC	300	(FURET et al., 2009)
	R_Bifid 06	TGATAGGACGCGACCCCA	300	
	P_Bifid	6FAM-CTCCTGGAAACGGGTG	250	

nM: nanomolar.

4.7 Análises estatísticas

O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado anterior a todos os testes realizados, com a finalidade de escolher o melhor tipo de teste para determinado conjunto de dados. Para a comparação de variáveis categóricas foi utilizado o teste Chi-square, enquanto para os testes de variáveis contínuas foi aplicado o teste Kruskal-Wallis ou One-Way ANOVA. Para as análises foi assumido um valor significativo de *P* menor ou igual a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Dados clínicos

No total, 50 RNPT foram incluídos no estudo. Destes, 11 foram excluídos por falta de acompanhamento nas coletas e 6 foram excluídos pelo preenchimento incorreto do TCLE. Ao longo do período de internação foram coletados os dados clínicos de cada RNPT, como peso, idade gestacional, uso de medicamentos, tempo de internação na UTIN, desfechos clínicos e uso de antibióticos (Tabela 2). Observa-se que os grupos são semelhantes entre vários parâmetros, entretanto, os grupos CPC e CPE fizeram uso de antibióticos mais vezes em comparação ao grupo CPP. Além disso, o grupo CPC fez mais o uso de NPP também comparado ao grupo CPP (Tabela 2). Ocorreram episódios de sepses nos grupos CPE e CPC, sendo dois episódios com isolamento de microrganismos, *Escherichia coli* e *Candida dubliniensis*, e o restante das sepses foram descritas como presumidas (Tabela 2).

Também foi registrado o tipo de dieta administrada diariamente até o 22º dia de vida ou fim da internação no hospital. A partir dos dados de dieta, pode-se observar na Tabela 2 a dieta predominante de cada grupo em três tempos diferentes. Os grupos CCE, CPE e CPC tiveram o colostro pasteurizado (CP) como dieta predominante até o 7º dia de vida, seguindo com predominância de leite humano pasteurizado (LHP) até o 15º dia de vida (Tabela 3). A partir do 15º dia de vida até o 22º, os grupos CPE e CPC permaneceram com LHP sendo a dieta predominante, diferenciando do grupo CCE, o qual teve predominância de FAPT (Tabela 3). O grupo CPP apresentou como dieta predominante desde o nascimento até o 22° dia de vida o LHP fornecido pelo BLH do hospital (Tabela 3). Foi determinado como dieta predominante o alimento ofertado mais que 60% de vezes em um intervalo de tempo, neste caso sendo os intervalos desde o nascimento até o 7° dia de vida, entre o 8° e 15° dia de vida e entre o 16° e 22° dia de vida.

Tabela 2 – Dados clínicos dos recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia

Dado clínico	**CCE (n= 7)**	**CPE (n= 9)**	**CPC (n= 10)**	**CPP (n= 7)**	**Teste estatístico**	**Valor de *P* significativo**
Idade gestacional (semanas)	31,3 (média) ± 2,2 (SD)	30 ± 1,7	30,6 ± 2,2	32,7 ± 1,1	Kruskal-Wallis	Não
Parto (CS/VG)	4/3	6/3	6/3	5/2	Chi-square	Não
Sexo (F/M)	3/4	3/6	6/4	6/1	Chi-square	Não
Tempo de colostroterapia (dias)	4,6 (variação 1-9)	4,2 (2-8)	4,3 (1-11)	1,7 (1-3)	Kruskal-Wallis	Não
Uso de antibióticos (n)	4	6	9	2	Kruskal-Wallis	Sim *
Uso de NPP (n)	3	6	8	0	Kruskal-Wallis	Sim **
Sepse (n)	0	1	5	0	Chi-square	Sim
Tempo de internação na UTIN (dias)	13,6 (2-42)	20,1 (10-33)	24 (6-42)	9,9 (1-19)	One-Way ANOVA	Não

CS: cesárea; VG: vaginal; n: número de casos; NPP: nutrição parenteral plena; UTIN: unidade de terapia intensiva neonatal. CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado. * CPP vs CPC e CPE; ** CPP vs CPC.

Tabela 3 – Dados sobre dieta predominante ao longo do tempo

Dieta predominante [a]	**CCE**	**CPE**	**CPC**	**CPP**
Até 7ºDV	CP	CP	CP	LHP
Até 15ºDV	LHP	LHP	LHP	LHP
Até 22ºDV	FAPT	LHP	LHP	LHP

DV: dia de vida; CP: colostro pasteurizado; LHP: leite humano pasteurizado; FAPT: formula aditivada para prematuro; CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado. [a] Alimento ofertado ao neonato em volumes equivalentes a mais de 60% em comparação ao volume diário total.

O Gráfico 1 apresenta o ganho de peso ao longo do tempo, no qual observa-se que os grupos CPE e CPC tendem a serem menores ao nascimento, porém estes são os grupos que apresentam maior ganho peso entre o 7° dia de vida e o 22° dia de vida. Nota-se ainda que a perda de peso entre o nascimento até o 7° dia de vida tende a ser maior nos grupos de colostroterapia exclusiva CCE e CPE em comparação aos demais grupos (Gráfico 1). Ao 22º dia de vida os grupos tendem a terem uma média de peso semelhante (Gráfico 1). Nenhuma diferença estatística foi encontrada nas comparações de peso.

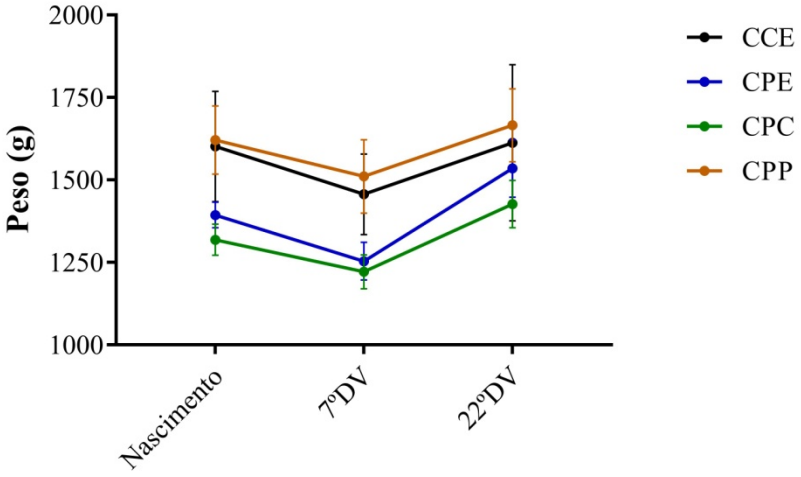


Gráfico 1 – Ganho de peso ao longo do tempo em recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia. DV: dia de vida; CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado.

5.2 Abundância relativa

As diferenças observadas na composição de Filos bacterianos da microbiota giram, principalmente, em torno de Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria. Observa-se uma diferença entre a composição dos Filos logo nas amostras S1 (Gráfico 2). Maiores abundâncias de Proteobacteria foram encontradas nas amostras S1 de CPE, CPC e CPP. Nesses mesmos grupos, há predomínio de Proteobactérias e Firmicutes ao longo do tempo, nas amostras S2 e S3. O grupo CCE possui além do filo Bacteroidetes uma amostra com predomínio de Tenericutes (Gráfico 2). O grupo CCE não apresentou um padrão nas amostras iniciais, entretanto nas amostras seguintes, S2 e S3, é possível observar abundância de Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobactérias (Gráfico 2). Existe abundância dos filos Proteobactéria e Firmicutes, ou ainda um equilíbrio entre estes, na maioria das amostras dos grupos CPE, CPC e CPP ao longo do tempo (Gráfico 2). Observa-se que no grupo CPE, as amostras S3 tendem a predomínio de Proteobactérias, enquanto as amostras S3 do grupo CPP tendem a terem o predomínio de Firmicutes (Gráfico 2).

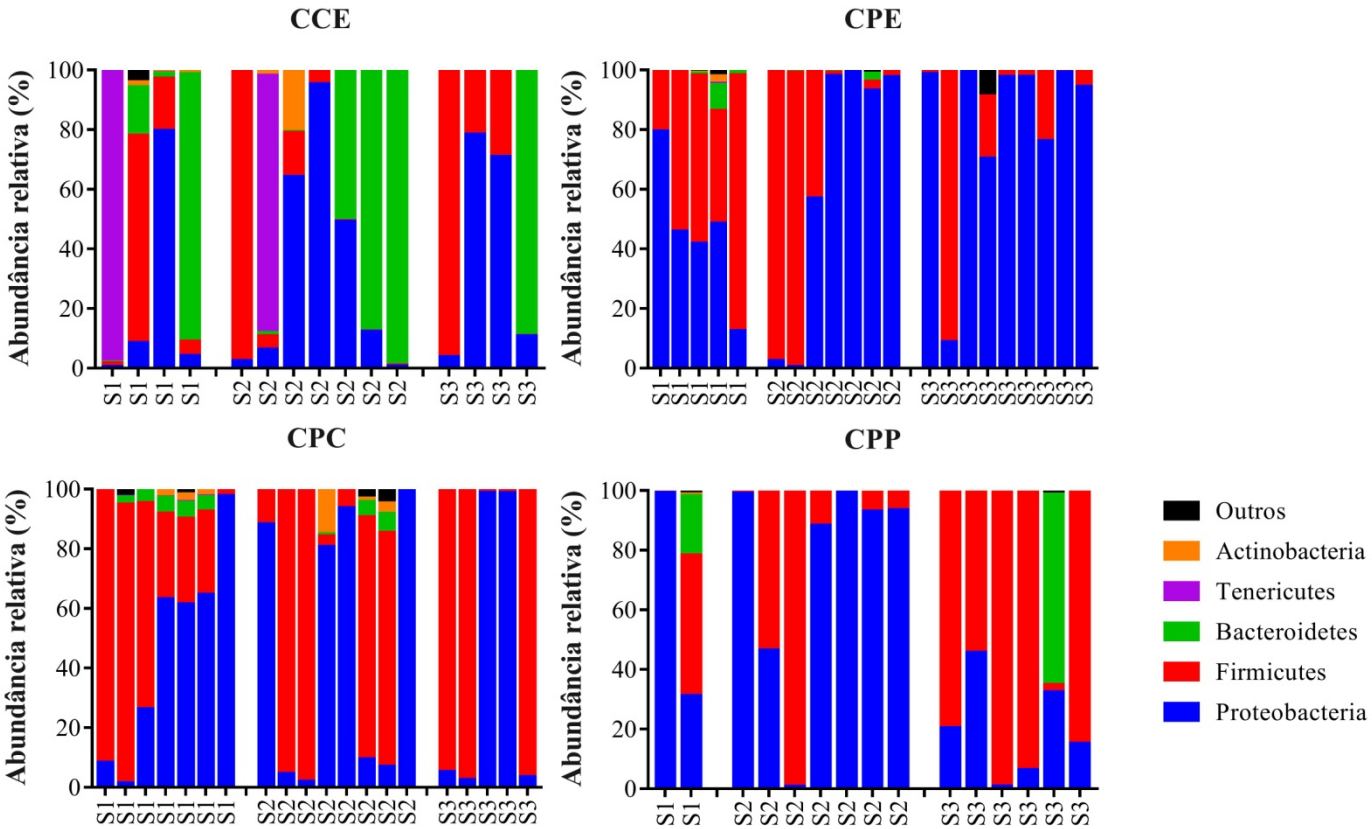


Gráfico 2 – Abundância relativa de filos bacterianos na microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia. CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à

colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado; S1: 1-3º dia de vida; S2: 7º dia de vida; S3: 22º dia de vida.

Com o objetivo de destacar a prevalência do filo Bacteroidetes no grupo CCE, foi construído um gráfico heatmap, no qual observa-se que os filos Proteobacteria e Firmicutes possuem prevalências semelhantes entres os grupos, porém, o filo Bacteroidetes é forte apenas no grupo CCE (Gráfico 3).

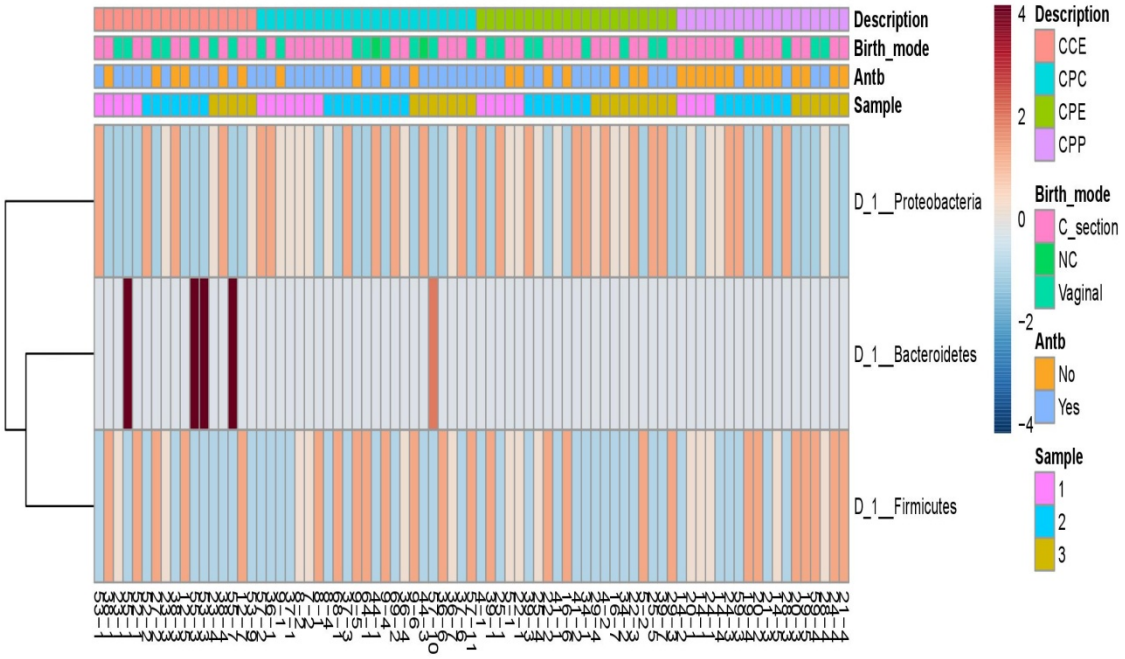


Gráfico 3 – Heatmap para filos bacterianos. Agrupado por grupo (Description). CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado.

Mediante as análises de abundância relativa para gêneros bacterianos, verifica-se que há uma intervariabilidade na composição da microbiota entre os grupos estudados, correspondente às diferenças observadas na análise de Filos. O grupo CCE apresentou

predominância de *Bacteroides* em amostras S2, correspondente ao 7° dia de vida do RNPT, além dos gêneros *Clostridium sensu stricto* e *Serratia* (Gráfico 4).

Observa-se que o gênero *Enterobacter* esteve em grande abundância em alguns tempos nos grupos CPE, CPC e CPP, assim como o gênero *Clostridium sensu stricto* (Gráfico 4). Nota-se também que o gênero *Staphylcoccus* esteve em maior predominância no grupo CPC e o gênero *Burkholderia-paraburkholderia* pode ser observado em abundância nos grupos CPE e CPC (Gráfico 4). Não foi encontrado um perfil de predominância nos tempos S1 e S2 do grupo CPP como ocorreu em S3, onde houve predomino de bactérias do gênero *Clostridium sensu stricto* (Gráfico 4).

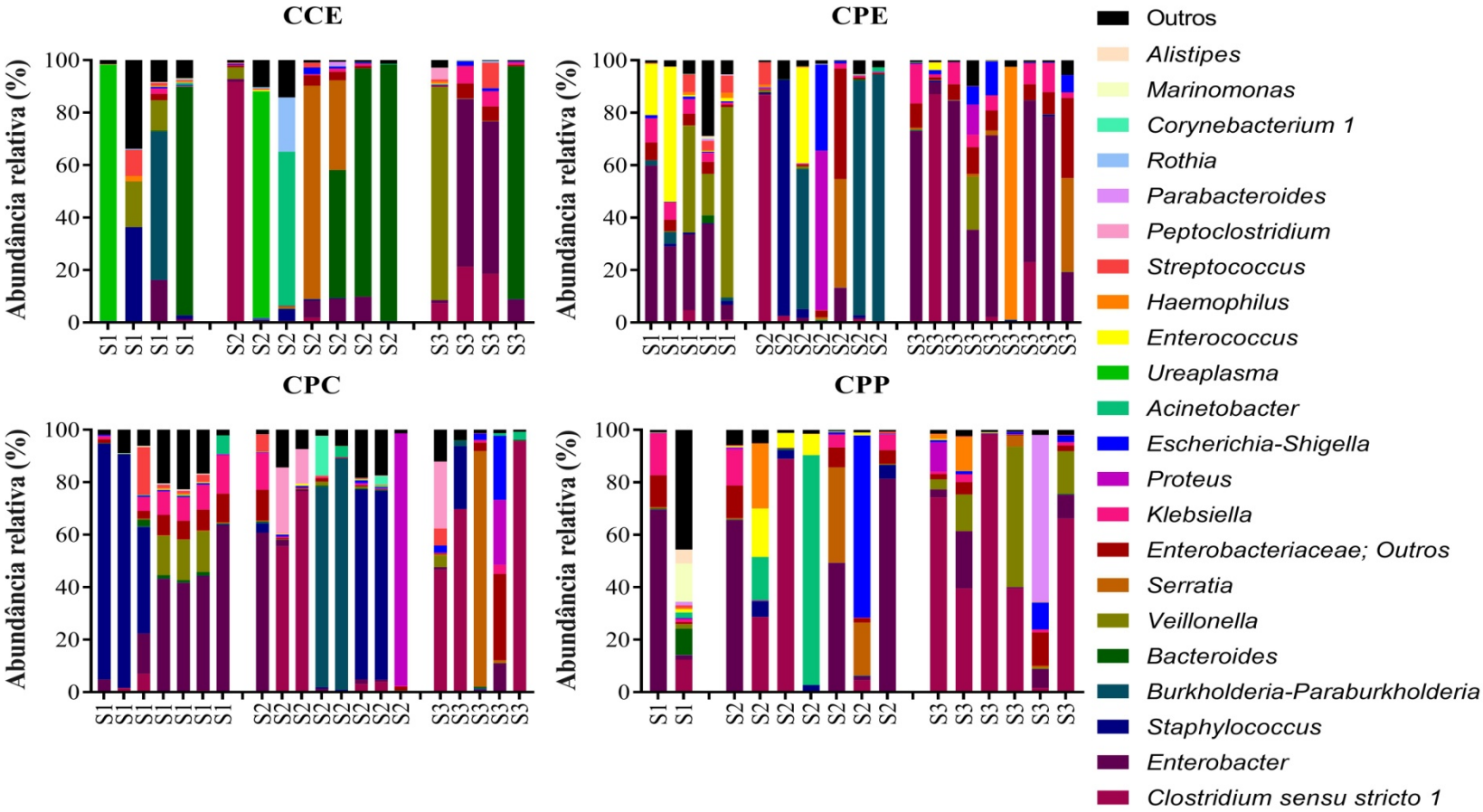


Gráfico 4 – Abundância relativa de gêneros bacterianos na microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia. Colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP:

submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado; S1: 1-3º dia de vida; S2: 7º dia de vida; S3: 22º dia de vida.

Dois casos de sepses com isolamento do microrganismo na hemocultura foram registrados durante o estudo. Observando os dois casos isoladamente nota-se que na sepse por *Candida dubliniensis*, a microbiota intestinal do RNPT possuía abundância relativa de 96,2% de *Proteus* (grupo CPC, Gráfico 4, barra 8 das amostras S2), enquanto que no caso de sepse por *Escherichia coli* tem-se abundância de 32,9% de *Escherichia-Shigella* e 60,7% de *Proteus* (grupo CPE, Gráfico 4, barra 4 das amostras S2), ambas as amostras coletadas ao 7° dia de vida. A composição da microbiota no ponto subsequente da amostra com predominância de *Escherichia-Shigella* e *Proteus* mostrou-se prevalência de *Enterobacter* (grupo CPE, Gráfico 4, barra 8 das amostras S3) após a administração do antibiótico no tratamento da sepse. Para o RNPT acometido por sepse fúngica, não houve coleta de amostra para análise após o tratamento.

Ao observar a prevalência dos gêneros bacterianos nas amostras fecais dos RNPT submetidos a colostroterapia, independente do tempo, é possível notar alguns gêneros característicos de cada grupos (Gráfico 5). Gêneros como *Escherichia-Shigella*, *Staphylococcus, Streptococcus* e *Clostridium sensu stricto* tendem a ter mais relação com os grupos que receberam leite pasteurizado (CPE, CPC e CPP, gráfico 5). O gênero *Bacteroides* novamente é observado como mais prevalente nos RNPT que receberam colostro fresco (Gráfico 5).

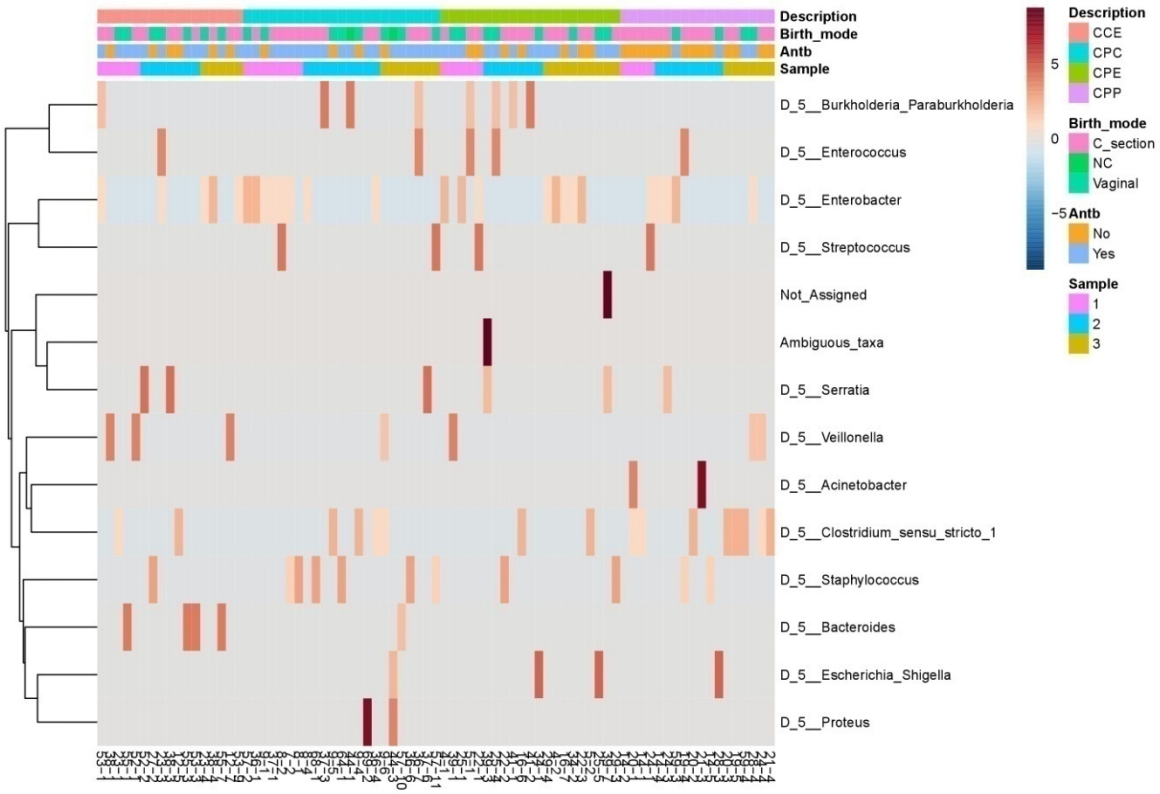
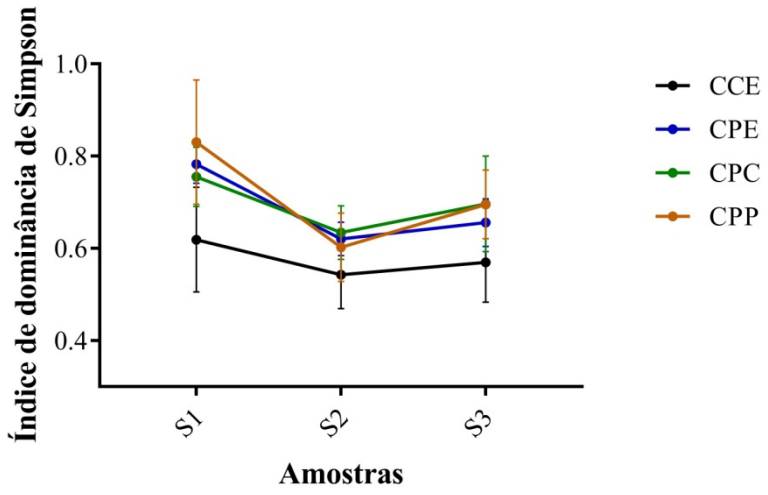


Gráfico 5 – Heatmap para gêneros bacterianos. Agrupado por grupo (Description). CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado.

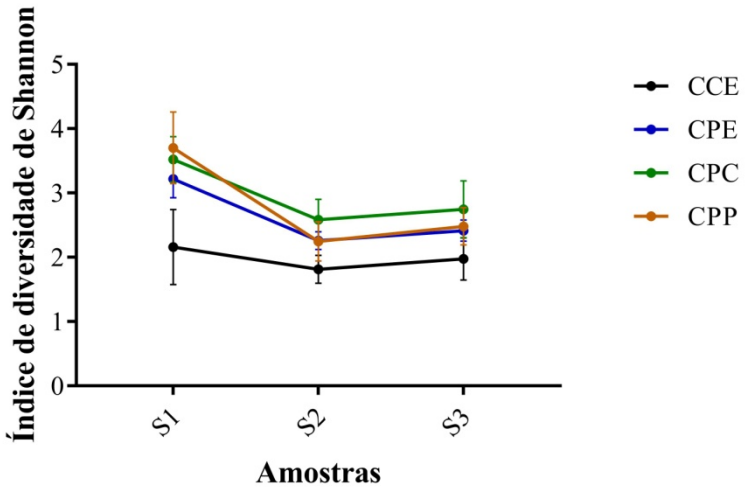
5.3 Análises de alfa diversidade

As análises de alfa diversidade nos permitem avaliar o quão dominante ou diversa a comunidade estudada tende a ser. Os valores de dominância de Simpson apontam que houve uma queda nestes valores entre as amostras S1 e S2, 1-3° e 7° dia de vida, nos quatro grupos de estudo e elevação destes níveis nas amostras S3 dos grupos que realizaram colostroterapia com colostro pasteurizado, principalmente no grupo CPP (Gráfico 6A). Observa-se que os valores de diversidade de Shannon tendem a diminuir entre S1 e S2 nos grupos estudados, porém seguem estáveis entre S2 e S3 (Gráfico 6B).

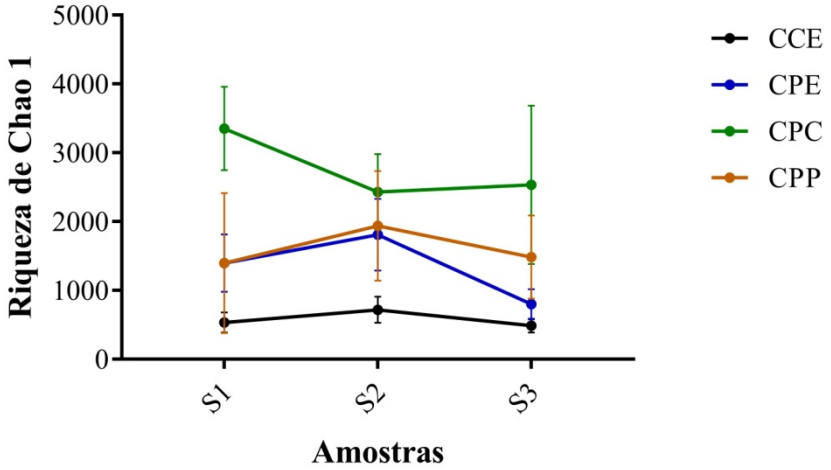
Enquanto para os índices de diversidade e dominância foi observado certo padrão de modulação entre os grupos, a modulação dos índices de riqueza da comunidade tende a ser diferente entre os grupos (Gráfico 6C). O grupo CCE não sofreu grande variação nos valores de Chao1 ao longo do tempo em comparação aos outros grupos (Gráfico 6C). Os grupos CPE e CPP ao longo do tempo tendem a apresentarem aumento nos valores de riqueza do índice de Chao1, seguido de diminuição deste índice em S3 (Gráfico 6C). Ainda através dos índices de riqueza, nota-se que o grupo CPC obteve queda nestes índices, seguido de um discreto aumento, ao longo dos três períodos analisados (Gráfico 6C). Além disso, os valores de riqueza do grupo CPC são mais elevados em comparação aos outros grupos em todo o período.



A



B



C

Gráfico 6 – Índices de alfa diversidade Simpson, Shannon e Chao 1. Índice de dominância de Simpson (A), índice de diversidade de Shannon (B) e índice de riqueza de Chao 1 (C). CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado; S1: 1-3º dia de vida; S2: 7º dia de vida; S3: 22º dia de vida.

5.4 Análises de beta diversidade

Para a avaliação da beta diversidade, foi estruturada análises de PCoA com base na matriz de distância UniFrac. Para avaliar as semelhanças na comunidade bacteriana entre os grupos, foi utilizada a matriz UniFrac ponderada e não ponderada (Figura 2). Com base na análise não ponderada, isto é, estrutura da comunidade bacteriana determinada pelos grupos independentemente da abundância (Figura 2A), podemos observar que os grupos de colostroterapia concomitante à dieta (CPP e CPC) formam *clusteres* independentes. As amostras referentes aos grupos com colostroterapia exclusiva não se agrupam, mostrando uma estrutura de comunidade bem diversa entre as amostras estudadas. Na análise ponderada, é visível que as amostras de cada grupo não tendem a se agruparem, dependente do grupo em que a amostra se encontra (Figura 2B).

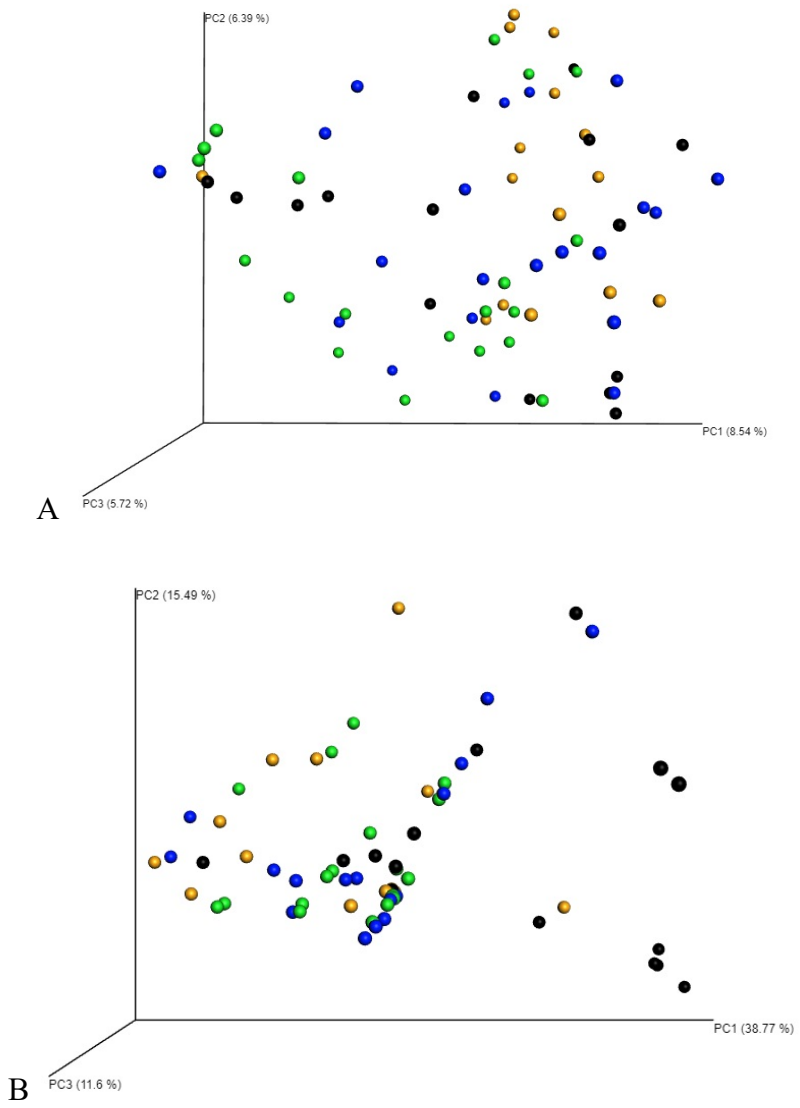


Figura 2 – PCoA com base na matriz de distância UniFrac para os grupos. Análises não ponderadas (A) e ponderadas (B). Grupos CCE (preto), CPE (azul), CPC (verde) e CPP (mostarda). CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado.

Outra análise com base na matriz de distância UniFrac foi construída com o objetivo de avaliar o quão semelhantes são as amostras de acordo com o tempo (Figura 3). O resultado da análise não ponderada indica que as amostras S1 e S3 tendem a formar *clusters* independentes, e S2 não apresentam tendência a agrupamento (Figura

3A). Da mesma maneira, as análises ponderadas não indicam um *cluster* das amostras S2 (Figura 3B). Estes resultados indicam que as amostras S2 possuem um perfil de comunidade distinto dos outros tempos, independente da abundância na comunidade, relacionado a transição entre os tempos de 2 (S1) a 22 (S3) dias de estudo.

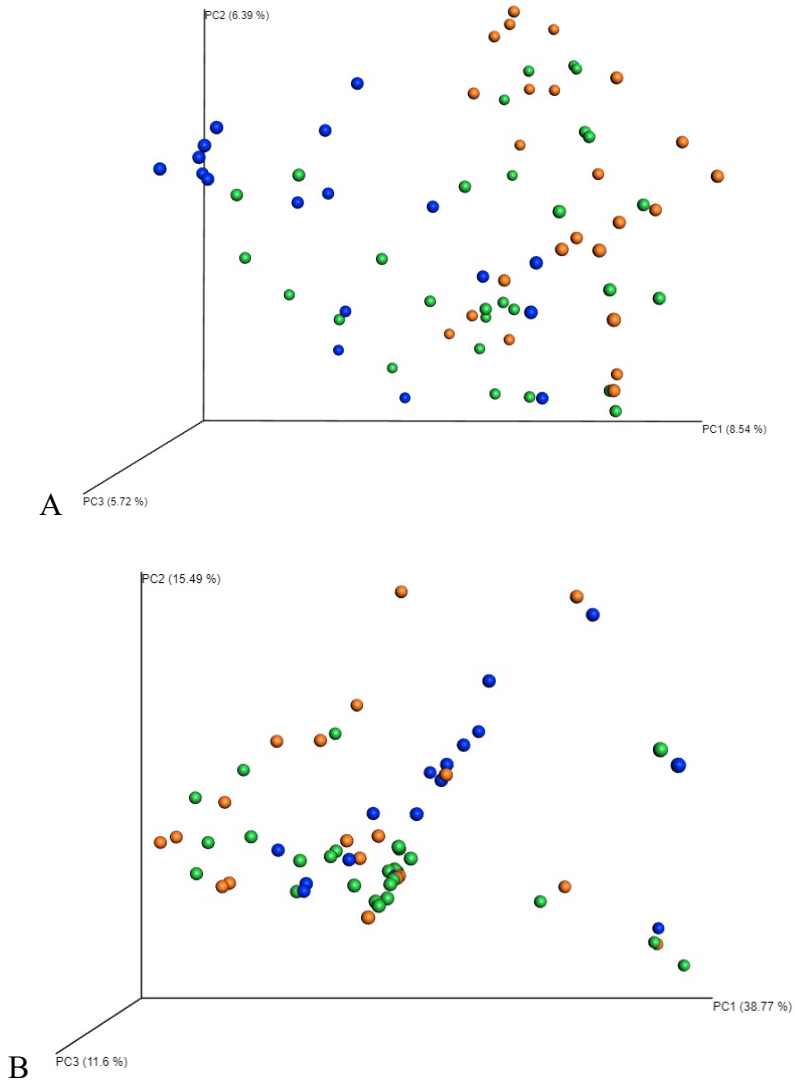


Figura 3 – PCoA com base nas distancias da UniFrac para as amostras. Análises não ponderadas (A) e ponderadas (B). Amostras S1 (azul), S2 (verde) e S3 (laranja). CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a

dieta predominante de leite humano pasteurizado; S1: 1-3º dia de vida; S2: 7º dia de vida; S3: 22º dia de vida.

5.5 Quantificação bacteriana

Através da técnica de PCR em tempo real, foi possível realizar a quantificação de bactérias totais e do gênero *Bifidobacterium* (Gráfico 7). Os resultados da quantificação mostram que os grupos CCE, CPE e CPC apresentam aumento de bactérias totais ao longo dos primeiros 22 dias de vida, tendo ainda os níveis em cada tempo analisado muito próximos entre os grupos (Gráfico 7A). Os níveis de bactérias totais no grupo CPP se mantiveram semelhantes nos três tempos analisados, sendo que as amostras S1, correspondentes ao 1-3º dia de vida do RNPT, tendem a terem maiores níveis de bactérias totais em comparação aos outros grupos de estudo (Gráfico 7A).

Assim como os resultados observados para bactérias totais, os grupos CCE, CPE e CPC apresentaram aumento nos níveis de *Bifidobacterium* ao longo do tempo (Gráfico 7B). No grupo CPP, observa-se que os níveis para este gênero bacteriano tendem a serem maiores em S1 comparado aos outros grupos estudados (gráfico 7B). Neste mesmo grupo, nota-se um aumento na quantidade de bifidobactéria ao 22° dia de vida, terceiro tempo analisado (gráfico 7B). Não houve presença do gênero *Bifidobacterium* durante o período estudado em apenas um RNPT incluído no estudo, este pertencente ao grupo CCE.

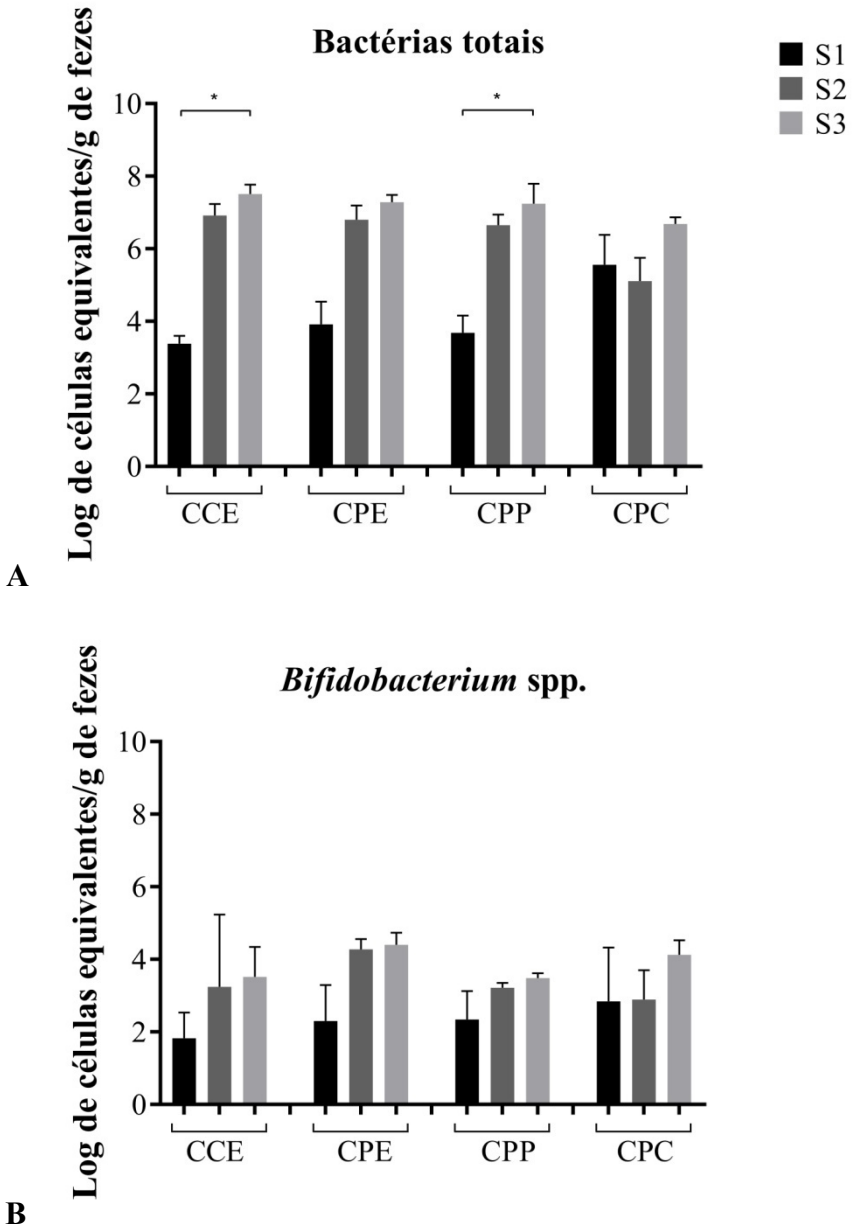


Gráfico 7 – Quantificação bacteriana por real time PCR. Quantificação de bactérias totais (A) e gênero *Bifidobacterium* (B) ao longo do tempo nos grupos estudados. CCE: submetidos à colostroterapia com colostro cru, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPE: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado, sendo as primeiras 24 horas de terapia exclusiva sem dieta via enteral; CPC: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de colostro pasteurizado; CPP: submetidos à colostroterapia com colostro pasteurizado acompanhado de dieta via enteral, sendo a dieta predominante de leite humano pasteurizado; S1: 1-3º dia de vida; S2: 7º dia de vida; S3: 22º dia de vida. * $P<0,005$.

6. DISCUSSÃO

Durante a gestação, o feto recebe diversos fatores bioativos presentes no líquido amniótico, fatores os quais o leite materno possui a capacidade de continuar a fornecer, protegendo o RN e auxiliando no desenvolvimento no período pós parto (WAGNER; TAYLOR; JOHNSON, 2008). Em RNPT, o aleitamento materno logo após o parto muitas vezes não ocorre em decorrência de várias intercorrências que acometem o RNPT no início da vida (CORPELEIJN et al., 2011; FANARO, 2013). É comum que o RNPT receba dieta via sonda, deixando de ter contato orofaríngeo com os fatores bioativos presentes no leite humano (GAROFALO; CAPLAN, 2019). Uma alternativa para garantir que o RNPT se desenvolva sem complicações e continue a receber fatores protetores é ofertar o colostro materno por via orofaríngea, em pequenas quantidades (GAROFALO; CAPLAN, 2019; RODRIGUEZ et al., 2010). Fatores bioativos ingeridos pelo bebê, através do líquido amniótico ou pelo colostro do leite humano, são absorvidos pelas mucosas e podem gerar efeito sistêmico (GAROFALO; CAPLAN, 2019).

A colostroterapia tem sido bem tolerada até aos menores RNPT e possui resultados clínicos promissores (GEPHART; WELLER, 2014; RODRIGUEZ et al., 2010). A caracterização da microbiota intestinal de RNPT submetidos à colostroterapia é mais um resultado que mostra os benefícios desta prática, podendo contribuir para a implantação desta imunoterapia oral em outras UTIN e consequentemente melhorando o bem-estar dos RNPT. O perfil da microbiota intestinal entre os grupos se mostrou diferente e desta maneira pudemos observar a modulação do colostro cru comparado ao colostro pasteurizado.

Sabe-se que RN a termo e em amamentação exclusiva possui um perfil de microbiota intestinal diferente de RNPT, apresentando alta prevalência de Proteobacteria ao nascimento, que tende a diminuir à medida que a diversidade da microbiota aumenta nas semanas subsequentes ao parto (BRANDT et al., 2012). Um estudo desenvolvido por Dahl e colaboradores mostrou que RNPT em amamentação exclusiva possuem abundância de Proteobacteria aos dez dias de vida, e posteriormente abundância de Firmicutes (DAHL et al., 2018). No presente estudo, observamos alta abundância e prevalência de bactérias dos filos Firmicutes e Proteobacteria nos

primeiros dias de vida na microbiota dos três grupos de RNPT que realizaram colostroterapia com colostro pasteurizado. Outro estudo também observou nos primeiros dias de vida uma abundância dos filos Firmicutes e Proteobactéria na microbiota intestinal de RNPT, os quais que recebiam uma dieta mista a base de leite materno e LHP (CONG et al., 2018).

A presença de gêneros do filo Proteobacteria pode ser potencialmente patogênica em bebês prematuros em ambiente hospitalar (ZOU et al., 2018). Bactérias do gênero *Enterococcus* ou da família *Enterobacteriaceae* são comumente encontradas no trato gastrintestinal (PENDERS et al., 2006), assim como também foram observadas nos RNPT submetidos a colostroterapia com colostro pasteurizado. No entanto, estas mesmas bactérias já foram relacionadas a contaminação ambiental hospitalar, podendo oferecer risco ao RNPT (MORA et al., 2016).

Casos de sepse neonatal já foram relacionados com bactérias presentes na microbiota do RN, e a mesma cepa isolada nas fezes do RN e na hemocultura já foram reportadas, sugerindo uma possível translocação bacteriana (CARL et al., 2014; MOLES et al., 2015; SHAW et al., 2015). Nos casos de sepses com confirmação por isolamento, foram identificados o fungo *C. dubliniensis* e a bactéria *E. coli* como causadoras. Sabendo que pode ocorrer translocação bacteriana da microbiota para a corrente sanguínea, desta maneira levando a uma septicemia, olhamos o perfil da microbiota intestinal dos RNPT de maneira isolada. Poucos dias após o isolamento da bactéria *E. coli* na hemocultura, a microbiota do bebê apresentava alta abundância do gênero *Escherichia-Shigella*. Em um recente estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, foi observada a relação entre casos de sepses em RNPT e diminuição da diversidade bacteriana (FEFERBAUM et al., 2017).

Além de bactérias comuns do trato gastrintestinal, como membros da família *Enterobacteriaceae*, a sepse neonatal tardia é comumente causada por *Staphylococcus* coagulase negativa (CARL et al., 2014; SHAW et al., 2015). Um estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa também ressaltou possíveis relações entre bactérias de alta abundância na microbiota intestinal de RN e a ocorrência de sepse neonatal (FEFERBAUM et al., 2018). Sabemos que no presente estudo contamos com apenas dois casos de sepse neonatal tardia com hemocultura positiva, entretanto o caso da *E. coli* poderia ser mais um de translocação bacteriana da microbiota intestinal para a

circulação, hipótese que poderia ser confirmada ou descartada com a identificação da cepa isolada. Esta mesma espécie já foi relacionada anteriormente com translocação por outros pesquisadores (CARL et al., 2014).

Neste estudo, o gênero *Clostridium sensu stricto* foi mais abundante nos grupos que realizaram colostroterapia com colostro pasteurizado e ao mesmo tempo recebiam dieta via enteral. Este gênero, também chamado de *cluster I*, inclui mais de 20 espécies de *Clostridium*, contendo alguns conhecidamente como potencialmente patogênicos, como *C. perfringens,* porém outras espécies comensais também foram descritas (WIEGEL; TANNER; RAINEY, 2006). A enterocolite necrosante, a qual afeta principalmente RNPT, é comumente relacionada a infecções por espécies do gênero *Clostridium* (CASSIR et al., 2015; HOURIGAN et al., 2016), entretanto, nenhum caso foi reportado nos RNPT incluídos neste trabalho. Trabalhos também já mostraram a presença de bactérias da família *Clostridiaceae* em RNPT sob amamentação exclusiva ou com dieta mista a base de leite materno e leite pasteurizado (CONG et al., 2018; DAHL et al., 2018). A espécie *C. butyricum*, incluída neste gênero, é capaz de utilizar vias de quinases que resultam na produção de butirato (RIVIÈRE et al., 2016).

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de caracterizar a microbiota do leite humano, utilizando desde técnicas de cultura-dependente à técnicas moleculares (JOST et al., 2015). Bactérias do gênero *Clostridium* foram encontradas em amostras de leite humano em alguns trabalhos publicados na literatura (COLLADO et al., 2009; JOST et al., 2014). Entretanto, bactérias do gênero *Clostridium* não foram isoladas em métodos de cultura-dependente, talvez por fatores antimicrobianos, como componentes bioativos e pH do leite humano, que reduzem a viabilidade destas bactérias (JOST et al., 2014). Esta dificuldade em isolar bactérias deste gênero no leite humano, impossibilita o estudo de provável transmissão vertical do leite para o RN. Mesmo sabendo que a presença deste gênero possa ter relação com o aleitamento materno, nossos resultados relacionaram o *Clostridium sensu stricto* aos grupos que receberam o colostro pasteurizado.

O gênero *Bacteroides* é um dos mais dominantes na microbiota intestinal no início da vida de RN sob amamentação exclusiva, juntamente com o gênero *Bifidobacterium* (JOST et al., 2015). Pudemos observar que o gênero em questão foi característico do grupo que realizou colostroterapia com o colostro fresco, sendo

altamente abundante na microbiota intestinal ao longo dos primeiros dias de vida. Espécies deste gênero são capazes de interagir com o epitélio intestinal, promovendo maturação do sistema imunológico e podendo reduzir respostas inflamatórias sistêmicas (MAZMANIAN; KASPER, 2006). A espécie *Bacteroides fragilis* possui mecanismo com efeitos probióticos, capazes de inibir a colonização de bactérias patogênicas (LI et al., 2017; ROUND et al., 2011). Sabendo que o ambiente de UTIN e uso de antibióticos são alguns fatores negativos para a colonização do RNPT, neste estudo mostramos que a administração do colostro materno como uma imunoterapia oral nas primeiras 24 horas de vida, pode ter sido capaz de proteger o RNPT através da modulação da microbiota intestinal. Com a colostroterapia houve presença de gêneros importantes para a proteção do RNPT por pelo menos até sua alta hospitalar e ida para a casa. Neste mesmo grupo que realizou a colostroterapia com colostro cru, não houve intercorrências clínicas, como a sepse neonatal.

O leite humano é uma fonte de bactérias, oligossacarídeos, citocinas e proteínas importantes para o desenvolvimento neonatal. Bactérias presentes em grande abundância no leite são comumente encontradas na microbiota intestinal do lactente, e a presença dos oligossacarídeos no leite tem papel fundamental como substrato para a prevalência de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Bacteroides* (BIAGI et al., 2017; JOST et al., 2015). Além disso, a presença dos oligossacarídeos impede a adesão de bactérias potencialmente patogênicas na mucosa intestinal, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *H. pylori*, contribuindo para a diminuição de infecções (JOST et al., 2015). A prática da colostroterapia com colostro pasteurizado, em casos onde o colostro fresco não está disponível, pode ter um papel como prebiótico natural, ou seja, substrato para a prevalência de bactérias benéficas.

A utilização do leite humano doado em RN é recomendada pela OMS quando o leite materno não está disponível, sendo a pasteurização do leite um processo necessário para a inativação de microrganismos. Com base nessa recomendação e sabendo os benefícios da colostroterapia, foi estabelecido no protocolo de colostroterapia do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros que para os RNPT em que o colostro fresco não estivesse disponível seria ofertado o colostro pasteurizado, doado ao BLH da unidade. Os RNPT receberam CP ou LHP pasteurizados a partir do método de Holder.

Estudos apontam que após o processo de pasteurização do leite humano por esta metodologia, alguns componentes presentes podem perder suas concentrações iniciais, como as imunoglobulinas IgA, IgM e IgG (ESCUDER-VIECO et al., 2018; PEILA et al., 2016). Alguns estudos mostraram também diminuição de leptina, adiponectina e insulina, enquanto outros apontam não haver diminuição, sugerindo que são necessários mais estudos para compreender o efeito da pasteurização Holder sob os hormônios presentes no leite humano (CHANG; CHEN; FANG, 2013; ESCUDER-VIECO et al., 2018; LEY et al., 2011). Entretanto, a pasteurização pelo método de Holder, não interfere na concentração original de oligossacarídeos, fornecendo ao neonato todos os benefícios dos oligossacarídeos do leite humano para a saúde neonatal (BERTINO et al., 2008; MARX et al., 2014). A presença de *Bifidobacterium* spp. observada na grande maioria dos RNPT e ao longo do tempo, reforça nossa idéia de que o perfil da microbiota intestinal observado nos grupos que receberam colostro pasteurizado, pode estar sendo influenciado pela presença dos oligossacarídeos presentes no leite pasteurizado.

Pesquisadores da Universidade da Florida, nos Estados Unidos, apontam que algumas bactérias do leite humano, como as bactérias ácido-lácticas, podem sobreviver e proliferar quando inoculadas no leite pasteurizado (CACHO et al., 2017). Neste estudo, os RNPT receberam dieta mista, ou seja, por mais que a deita predominante tenha sido o LHP, em algum momento estes bebês também receberam o leite materno fresco, ocorrendo transferência da microbiota do leite para o trato gastrintestinal do mesmo.

A detecção de bifidobactérias pode ser dificultada dependendo da metodologia aplicada e já se sabe que a amplificação da região V4 do gene *16S rRNA* possui esta limitação (BRANDT et al., 2012). Por este motivo e com o objetivo de estudar a presença do gênero *Bifidobacterium* nos RNPT submetidos à colostroterapia, foi empregado a metodologia de PCR em tempo real, possibilitando a quantificação deste gênero bacteriano. O ambiente hospitalar em conjunto com o uso de antibióticos são fatores desfavoráveis para a permanência das bifidobactérias no ambiente intestinal (ZOU et al., 2018), entretanto, mesmo com estes fatores houve a presença continua deste gênero nos RNPT deste trabalho submetidos à colostroterapia.

Abundância e prevalência de *Bifidobacterium* na microbiota intestinal do RN normalmente são associadas a uma microbiota saudável e ideal (WALKER, 2010). Espécies pertencentes a este gênero, como *B. breve* e *B. longum*, possuem alta capacidade de metabolização de uma variedade de oligossacarídeos, tornando este gênero uma importante fonte de produção de AGCC (BOTTACINI; VAN SINDEREN; VENTURA, 2017). Estas bactérias possuem também efeitos imunológicos e são capazes de estimular a produção de IgA, contribuindo para a diminuição de doenças atópicas em crianças (WALKER, 2010).

Estudos apontam que a microbiota intestinal de RN em amamentação exclusiva tende a ser menos diversa comparada a RN sob administração de fórmula, entretanto, a microbiota intestinal tende a se diversificar em longo prazo, como a partir dos três meses de idade (PANNARAJ et al., 2017; WANG et al., 2015). Esta baixa diversidade no início da vida é necessária para que ocorra a sucessão de bactérias anaeróbias facultativas para as anaeróbias estritas (PALMER et al., 2007). Em RNPT submetidos a colostroterapia há estabilidade na diversidade da microbiota intestinal entre o 7° e 22° dia de vida. Quando administrado o colostro fresco na prática da colostroterapia, observa-se que os níveis de diversidade são menores em comparação a microbiota do RNPT que recebem o colostro pasteurizado.

Na administração de colostro pasteurizado como imunoterapia oral, a comunidade intestinal tende a apresentar maior dominância, sendo que no grupo CPP, acreditamos que o aumento nos índices de dominância observados ao 22° dia de vida possa ser relacionado ao gênero *Clostridium sensu stricto*, prevalente e abundante neste grupo e período. Os índices de riqueza também indicam a tendência destes grupos a apresentarem uma comunidade mais rica, comprado ao grupo que recebeu colostro fresco. Entre os índices de diversidade, o índice de riqueza foi o único o qual observamos diferenças entre os grupos de colostro pasteurizado. A administração do colostro pasteurizado como dieta predominante revela que a microbiota intestinal deste grupo tende a ser mais diversa em todo o período analisado.

Em relação ao ganho de peso do RN ou RNPT quando recebe leite materno, LHP ou fórmula, os estudos são controversos. Estudos já apontaram que o LHP pode atrasar o ganho de peso de quando comparado a dieta com leite materno ou fórmula, porém, outros estudos não encontraram diferenças no ganho de peso (BROWNELL et

al., 2018; CONNOR et al., 2016; HOBAN et al., 2019; MADORE et al., 2017). Em nosso estudo, não observamos diferença estatística no ganho de peso entre os grupos até o 22° dia de vida, mas pudemos observar a tendência dos grupos CPC e CPE a ganharem mais peso entre o nascimento e o 22° dia de vida, quando comparados aos outros grupos. Entretanto, nosso estudo conta com as limitações: curto período de tempo para avaliação do peso e baixa quantidade de leite materno oferecido. Desta maneira, não pudemos avaliar se a administração do colostro cru ou pasteurizado influencia no ganho de peso do RNPT.

Neste estudo, além de compararmos a modulação do colostro cru e pasteurizado na microbiota intestinal de RNPT a partir da colostroterapia exclusiva, pudemos estudar se o colostro pasteurizado desempenha um papel diferente que o leite humano pasteurizado na microbiota do RNPT. Entre os grupos nota-se que existe diferença na comunidade através das análises de abundância relativa, assim como os resultados da beta diversidade, que mostram separação das amostras pertencentes aos grupos CPC e CPP. Além disso, a forte presença de bifidobactérias e aumento contínuo ao longo dos primeiros dias de vida é um resultado que pode ser utilizado para reforçar o uso do leite pasteurizado na ausência do leite fresco, mostrando que o mesmo pode favorecer a prevalência de gêneros benéficos para a microbiota intestinal do RNPT.

7. CONCLUSÕES

- A administração de colostro fresco oral logo após o nascimento, antes da introdução da dieta enteral, foi capaz de favorecer bactérias do gênero *Bacteroides* na microbiota intestinal do RNPT.

- A administração de colostro, cru ou pasteurizado, antes da introdução da dieta enteral, teve uma correlação positiva com maiores abundâncias de *Bifidobacterium* aos 7 e 22 dias de vida.

- Maiores abundâncias e Proteobacteria foram encontradas nos grupos que receberam colostroterapia com colostro pasteurizado, independente da dieta.

- O colostro pasteurizado foi capaz de favorecer a prevalência de bactérias benéficas para a microbiota intestinal.

“Declaro que o documento de defesa de dissertação apresentado foi escrito por mim e que as citações de outros autores estão devidamente indicadas e referenciadas no texto. Declaro, ainda, que esse documento foi submetido a análise de similaridade pela ferramenta CopySpider para garantir sua integridade quanto à ocorrência de plágio.”

REFERÊNCIAS

AAGAARD, K. et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 237, 2014.

BERTINO, E. et al. Effects of holder pasteurization on human milk oligosaccharides. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 381–385, 2008.

BIAGI, E. et al. The bacterial ecosystem of mother's milk and infant's mouth and gut. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–9, 2017.

BOTTACINI, F.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 24, p. 4137–4152, 2017.

BÖTTCHER, M. F.; JENMALM, M. C.; BJÖRKSTÉN, B. Cytokine, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 14, n. 1, p. 35–41, 2003.

BRANDT, K. et al. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. **Clinics**, v. 67, n. 2, p. 113–123, 2012.

BROWN, E. M.; SADARANGANI, M.; FINLAY, B. B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. **Nat Immunol**, v. 14, n. 7, p. 660–667, 2013.

BROWNELL, E. A. et al. Dose-response Relationship Between Donor Human Milk, Mother's Own Milk, Preterm Formula, and Neonatal Growth Outcomes. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 67, n. 1, p. 90–96, 2018.

CACHO, N. T. et al. Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–12, 2017.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-througput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CARL, M. A. et al. Sepsis from the gut: The enteric habitat of bacteria that cause late-onset neonatal bloodstream infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 9, p. 1211–1218, 2014.

CAROLAN, M.; MIDWIFERY, A. Maternal age Z 45 years and maternal and perinatal outcomes : A review of the evidence. **Midwifery**, v. 29, n. 5, p. 479–489, 2013.

CASSIR, N. et al. Clostridium butyricum Strains and Dysbiosis Linked to Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 7, p. 1107–1115, 2015.

CASTELLOTE, C. et al. Premature Delivery Influences the Immunological Composition of Colostrum and Transitional and mature human milk. **J Nutr**, v. 141, n. 6, p. 1181–1187, 2011.

CHANG, J.; CHEN, C.; FANG, L. Influence of Prolonged Storage Process , Pasteurization , and Heat Treatment on Biologically-active Human Milk Proteins. **Pediatrics and Neonatology**, v. 54, n. 6, p. 360–366, 2013.

CHAO, A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.

CLAUD, E. C.; SAVIDGE, T. O. R.; WALKER, W. A. Modulation of Human Intestinal Epithelial Cell IL-8 Secretion by Human Milk Factors. **Pediatr Res**, v. 53, n. 3, p. 419–425, 2003.

CNATTINGIUS, S. The epidemiology of smoking during pregnancy : Smoking prevalence , maternal characteristics , and pregnancy outcomes. **Nicotine Tob Res**, v. 6, n. April, 2004.

COLLADO, M. C. et al. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 523–528, 2009.

COLLADO, M. C. et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 1–13, 2016.

CONG, X. et al. Influence of Feeding Type on Gut Microbiome Development in Hospitalized Preterm Infants. **Nurs Res**, v. 66, n. 2, p. 123–133, 2018.

CONNOR, D. L. O. et al. Effect of Supplemental Donor Human Milk Compared With Preterm Formula on Neurodevelopment of Very Low-Birth-Weight Infants at 18 Months A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 316, n. 18, p. 1897–1905, 2016.

CORPELEIJN, W. E. et al. Feeding very-low-birth-weight infants: Our aspirations versus the reality in practice. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, n. SUPPL. 1, p. 20–29, 2011.

CORPELEIJN, W. E. et al. Intake of own Mother's milk during the first days of life is associated with decreased morbidity and mortality in very low birth weight infants during the first 60 days of life. **Neonatology**, v. 102, n. 4, p. 276–281, 2012.

DAHL, C. et al. Preterm infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure. **International Journal of Epidemiology**, n. April, p. 1–12, 2018.

DHARIWAL, A. et al. MicrobiomeAnalyst : a web-based tool for comprehensive statistical , visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 180–188, 2017.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11971–11975, 2010.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20–32, 2015.

DONG, Y.; SPEER, C. P. Late-onset neonatal sepsis:Recent developments. **Archives of**

Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition, v. 100, n. 3, p. F257–F263, 2015.

DUNCAN, S. H.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Lactate-Utilizing Bacteria , Isolated from Human Feces , That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5810–5817, 2004.

ESCUDER-VIECO, D. et al. Effect of HTST and Holder Pasteurization on the Concentration of Immunoglobulins , Growth Factors , and Hormones in Donor Human Milk. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. September, p. 1–12, 2018.

FALLANI, M. et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1385–1392, 2011.

FANARO, S. Feeding intolerance in the preterm infant. **Early Human Development**, v. 89, n. SUPPL2, 2013.

FEFERBAUM, R. et al. MON-P016: Establishment of Intestinal Microbiota in Surgical Newborns with Intestinal Failure. **Clinical Nutrition**, v. 36, p. S185, 2017.

FEFERBAUM, R. et al. Surgical newborns and the intestinal microbiome colonization: Dysbiotic relationship. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. April, p. S275, 2018.

FERNÁNDEZ, L. et al. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 1–10, 2013.

FLINT, H. J. et al. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 760, n. December 2013, p. 13–22, 2014.

FORSGREN, M. et al. Late preterm birth has direct and indirect effects on infant gut microbiota development during the first six months of life. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 106, n. 7, p. 1103–1109, 2017.

FREITAS, J. et al. Maternal , fetal and neonatal consequences associated with the use of crack cocaine during the gestational period : a systematic review and meta - analysis. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 298, n. 3, p. 487–503, 2018.

FROST, B. L. et al. Maternal breast milk transforming growth factor-beta and feeding intolerance in preterm infants. **Pediatric research**, v. 76, n. 4, p. 386–393, 2014.

FURET, J. et al. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 68, n. 3, p. 351–362, 2009.

GAROFALO, N. A.; CAPLAN, M. S. Oropharyngeal Mother's Milk: State of the Science and Influence on Necrotizing Enterocolitis. **Clinics in Perinatology**, v. 46, n. 1, p. 77–88, 2019.

GEPHART, S. M.; WELLER, M. Colostrum as oral immune therapy to promote neonatal health. **Advances in Neonatal Care**, v. 14, n. 1, p. 44–51, 2014.

GOSALBES, M. J. et al. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 43, n. 2, p. 198–211, 2013.

GROER, M. W. et al. The very low birth weight infant microbiome and childhood

health. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 105, n. 4, p. 252–264, 2015.

HOBAN, R. et al. Impact of donor milk on short-and long-term growth of very low birth weight infants. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 1–12, 2019.

HOURIGAN, S. K. et al. The Microbiome in Necrotizing Enterocolitis: A Case Report in Twins and Minireview. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 4, p. 747–753, 2016.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.

JIMÉNEZ, E. et al. Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. **Curr Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 270–274, 2005.

JOHNSON, T. J. et al. Cost savings of human milk as a strategy to reduce the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. **Neonatology**, v. 107, n. 4, p. 271–276, 2015.

JOST, T. et al. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2891–2904, 2014.

JOST, T. et al. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 7, p. 426–437, 2015.

KOZICH, J. J. et al. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112–5120, 2013.

LEE, C.; LEE, S.; SHIN, S. G. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number : absolute and relative quantification assays with Escherichia coli. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 78, p. 371–376, 2008.

LEE, J. et al. Oropharyngeal colostrum administration in extremely premature infants: An RCT. **Pediatrics**, v. 135, n. 2, p. e357–e366, 2015.

LEY, S. H. et al. Effects of Pasteurization on Adiponectin and Insulin Concentrations in Donor Human Milk. **Pediatr Res**, v. 70, n. 3, p. 278–281, 2011.

LI, Z. et al. Bioluminescence Imaging to Track Bacteroides fragilis Inhibition of Vibrio parahaemolyticus Infection in Mice. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, n. May, p. 1–9, 2017.

LOFTIN, R. W. et al. Late Preterm Birth. **Rev Obstet Gynecol**, v. 3, n. 1, p. 10–19, 2010.

LÖNNERDAL, B. Bioactive Proteins in Human Milk: Mechanisms of Action. **Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2 SUPPL., 2010.

LOZUPONE, C. A. et al. Quantitative and Qualitative $^{N}_{L}$ Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1576–1585, 2007.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

MADORE, L. S. et al. Effects of Donor Breastmilk Feeding on Growth and Early Neurodevelopmental Outcomes in Preterm Infants : An Observational Study. **Clinical Therapeutics**, v. 39, n. 6, p. 1210–1220, 2017.

MAI, V. et al. Distortions in Development of Intestinal Microbiota Associated with Late Onset Sepsis in Preterm Infants. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.

MANZONI, P. Clinical Benefits of Lactoferrin for Infants and Children. **Journal of Pediatrics**, v. 173, p. S43–S52, 2016.

MARTIN, R. et al. Early-Life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–30, 2016.

MARX, C. et al. Human milk oligosaccharide composition differs between donor milk and mother's own milk in the NICU. **Journal of Human Lactation**, v. 30, n. 1, p. 54–61, 2014.

MAZMANIAN, S. K.; KASPER, D. L. The love – hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 11, p. 849–858, 2006.

MOLES, L. et al. Preterm infant gut colonization in the neonatal ICU and complete restoration 2 years later. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 10, p. 936.e1-936.e10, 2015.

MORA, M. et al. Microorganisms in confined habitats: Microbial monitoring and control of intensive care units, operating rooms, cleanrooms and the international space station. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. October, p. 1–20, 2016.

MORO, G. E. et al. Processing of Donor Human Milk : Update and Recommendations From the European Milk Bank Association (EMBA). **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, n. February, p. 1–10, 2019.

MURPHY, K. et al. The Composition of Human Milk and Infant Faecal Microbiota Over the First Three Months of Life: A Pilot Study. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 40597, 2017.

NAVAS-MOLINA, J. A. et al. Advancing our undertanding of the human microbiome using QIIME. **Methods Enzymol**, v. 531, p. 371–444, 2013.

PALMER, C. et al. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. **PLoS Biol**, v. 5, n. 7, p. e177, 2007.

PANNARAJ, P. S. et al. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 7, p. 647–654, 2017.

PATEL, A. B.; SHAIKH, S. Efficacy of breast milk gastric lavage in preterm neonates. **Indian Pediatrics**, v. 44, n. 3, p. 199–203, 2007.

PATEL, A. L. et al. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. **Journal of Perinatology**, v. 33, n. 7, p. 514–519, 2013.

PEILA, C. et al. The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk : A Review. **Nutrients**, n. Dm, p. 1–19, 2016.

PENDERS, J. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 511–521, 2006.

PLATT, M. J. Outcomes in preterm infants. **Public Health**, v. 128, n. 5, p. 399–403, 2014.

PLAZA-DÍAZ, J.; FONTANA, L.; GIL, A. Human milk oligosaccharides and immune system development. **Nutrients**, v. 10, n. 8, 2018.

PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30–37, 2014.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project : improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. November 2012, p. 590–596, 2013.

RAJANI, P. S.; SEPPO, A. E.; JÄRVINEN, K. M. Immunologically Active Components in Human Milk and Development of Atopic Disease , With Emphasis on Food Allergy , in the Pediatric Population. v. 6, n. August, p. 1–13, 2018.

RESCIGNO, M. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 361–367, 2001.

RIVIÈRE, A. et al. **Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gutFrontiers in Microbiology**, 2016.

RODRIGUEZ, N. A. et al. A pilot study to determine the safety and feasibility of oropharyngeal administration of own mother's colostrum to extremely low-birth-weight infants. **Advances in Neonatal Care**, v. 10, n. 4, p. 206–212, 2010.

RODRIGUEZ, N. A. et al. Oropharyngeal administration of mother ' s colostrum , health outcomes of premature infants : study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, p. 1–14, 2015.

ROMANO-KEELER, J. et al. Oral colostrum priming shortens hospitalization without changing the immunomicrobial milieu. **Journal of Perinatology**, v. 37, n. 1, p. 36–41, 2017.

ROUND, J. L. et al. The Toll-Like Receptor 2 Pathway Commensal of the Human Microbiota. **Science**, v. 1007172, n. May, p. 974–978, 2011.

SAÚDE, M. DA. **Bases para a discussão da Política Nacional de Promoção , Proteção e Apoio ao Aleitamento Materno Bases para a discussão da Política Nacional de Promoção , Proteção e Apoio ao Aleitamento Materno**. [s.l: s.n.].

Secretaria de Estado de Saúde. **UGA IV - HOSPITAL E MATERNIDADE**

LEONOR MENDES DE BARROS. Disponível em: http://saude.sp.gov.br/coordenadoria-de-recursos-humanos/areas-da-crh/qualidade-de-vida-do-trabalhador-da-saude/programa-de-preparacao-para-a-aposentadoria/o-programa-nas-unidades/uga-iv-hospital-e-maternidade-leonor-mendes-de-barros. Acesso em: 07/11/2019.

SCHOLTENS, P. A. M. J. et al. The Early Settlers : Intestinal Microbiology in Early Life. **Annual Review Food Sci Technol**, p. 425–447, 2012.

SEIGEL, J. K. et al. Early Administration of Oropharyngeal Colostrum to Extremely Low Birth Weight Infants. **Breastfeeding Medicine**, v. 8, n. 6, p. 491–495, 2013.

SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, n. April 1928, p. 379- 423,623-656, 1948.

SHAW, A. G. et al. Late-Onset Bloodstream Infection and Perturbed Maturation of the Gastrointestinal Microbiota in Premature Infants. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132923, 2015.

SMITH, G. C. S.; PELL, J. P. Teenage pregnancy and risk of adverse perinatal outcomes associated with first and second births: Population based retrospective cohort study. **BMJ**, v. 323, p. 476, 2001.

SNYDER, R. et al. Early provision of oropharyngeal colostrum leads to sustained breast milk feedings in preterm infants. **Pediatrics and Neonatology**, v. 58, n. 6, p. 534–540, 2017.

SOARES, L. G. et al. Captação e Aproveitamento de Leite Humano em um Banco de Leite de um Município do Estado do Paraná. **Rev Fund Care Online**, v. 10, n. 3, p. 656–662, 2018.

SOHN, K. et al. Buccal administration of human colostrum: Impact on the oral microbiota of premature infants. **Journal of Perinatology**, v. 36, n. 2, p. 106–111, 2016.

STODDARD, S. F. et al. rrnDB : improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 593–598, 2015.

TAFT, D. H. et al. Center Variation in Intestinal Microbiota Prior to Late-Onset Sepsis in Preterm Infants. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 2015.

TAYLOR, S. N. et al. Intestinal permeability in preterm infants by feeding type: Mother's milk versus formula. **Breastfeeding Medicine**, v. 4, n. 1, p. 11–15, 2009.

THIBEAU, S.; BOUDREAUX, C. Exploring the use of mothers' own milk as oral care for mechanically ventilated very low-birth-weight preterm infants. **Advances in Neonatal Care**, v. 13, n. 3, p. 190–197, 2013.

TURIN, C. G. et al. Lactoferrin concentration in breast milk of mothers of low-birth-weight newborns. **Journal of Perinatology**, v. 37, n. 5, p. 507–512, 2017.

UNICEF. **The state of the world's children 2014 in nuber: Every child counts**. [s.l: s.n.].

VANGAY, P. et al. Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 5, p. 553–564, 2015.

VOGEL, J. P. et al. Global, regional and national levels and trends of preterm birth rates for 1990 to 2014: Protocol for development of World Health Organization estimates. **Reproductive Health**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2016.

VOGEL, J. P. et al. The global epidemiology of preterm birth. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, 2018.

WAGNER, C. L.; TAYLOR, S. N.; JOHNSON, D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 34, n. 2, p. 191–204, 2008.

WALKER, A. Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients. **Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2 SUPPL., p. S3–S7, 2010.

WANG, M. et al. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, n. 6, p. 825–833, 2015.

WHITTAKER, R. H. Evolution and Measurement of Species Diversity. **International Association for Plant Taxonomy**, v. 21, p. 213–251, 1972.

WIEGEL, J.; TANNER, R.; RAINEY, F. A. An Introduction to the Family Clostridiaceae. In: DWORKIN, M. et al. (Eds.). . **The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria**. New York, NY: Springer US, 2006. p. 654–678.

ZHANG, T.; SHAO, M.; FANG, H. H. A qRT-PCR-based method for the measurement of rrn operon copy number. **Lett Appl Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 26–30, 2009.

ZHANG, Y. et al. Oropharyngeal Colostrum Administration in Very Low Birth Weight Infants. **Pediatric Critical Care Medicine**, p. 1, 2017.

ZOU, Z. H. et al. Prenatal and postnatal antibiotic exposure influences the gut microbiota of preterm infants in neonatal intensive care units. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2018.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da microbiota de recém - nascidos submetidos a colostroterapia
Pesquisador: Carla Taddei de Castro Neves
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 76151717.0.0000.0067
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.542.854

Apresentação do Projeto:
A colonização inicial da microbiota intestinal humana é de suma importância, desempenhando papel fundamental no desenvolvimento imunológico, nutricional, metabólico e neurológico. Recém-nascidos prematuros e de baixo peso muitas vezes precisam permanecer internados em unidades de terapia intensiva, e frequentemente a dieta enteral trófica é limitada em consequência da imaturidade do sistema digestivo ou estado clínico do recém-nascido. Dentro deste contexto, a colostroterapia é uma prática segura, viável e bem tolerada até mesmo pelos menores prematuros. Evidências preliminares defendem o efeito da colostroterapia em reduzir o tempo de alimentação enteral total. Sendo assim, o objetivo deste projeto é avaliar o estabelecimento da microbiota intestinal em neonatos prematuros submetidos à colostroterapia. Para isso, será realizado um ensaio clínico, longitudinal, onde serão recrutados 30 neonatos prematuros, onde 15 serão alocados no grupo que receberá colostro de origem direta (cru) e 15 serão alocados no grupo que receberá colostro proveniente do banco de leite (pasteurizado). Serão coletadas amostras de fezes dos neonatos, colostro materno e colostro do banco de leite no período de estudo (3 a 4 semanas), para análise metagenômica das fezes e do leite e metatranscriptômica das fezes, além de dosagem de ácidos graxos de cadeia curta e IgA nas fezes e no colostro. Para análise estatística, será utilizado o teste linear geral (GLM),

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

no software SPSS, com significância de 5%. A hipótese do presente estudo é que a microbiota intestinal de prematuros graves que receberem colostro materno cru apresentará diferenças, ou seja, será melhor modulada, quando comparados com prematuros graves que receberem colostro pasteurizado.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem como objetivo avaliar o estabelecimento da microbiota intestinal em neonatos prematuros submetidos à colostroterapia de origem direta (cru) e neonatos prematuros submetidos à colostroterapia proveniente do banco de leite (pasteurizado).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A colostroterapia é uma rotina já realizada, e não implica em riscos para o recém-nascido. A pesquisa de microbiota em pacientes submetidos à colostroterapia terá risco mínimo.

Benefícios:

Os resultados da pesquisa poderão evidenciar os benefícios da colostroterapia na microbiota de neonatos prematuros. Desta forma, novas práticas terapêuticas poderão ser difundidas em centros neonatais, com objetivo de modular positivamente a microbiota intestinal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante, pois os resultados poderão contribuir para a implementação de terapias acessórias no acompanhamento de recém-nascidos prematuros, objetivando a diminuição de intercorrências clínicas como a sepse.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi corrigido conforme indicação e os termos substituídos por outros mais simples. Foi incluído o termo "riscos mínimos" conforme exigência da legislação e as anuências e outros documentos estão corretos e inclusos na Plataforma.

Recomendações:

Sem recomendações e pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O proponente cumpriu as exigências anteriores, logo considero o projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto está em conformidade com a legislação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_977792.pdf	08/03/2018 21:50:57		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.pdf	08/03/2018 20:59:07	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	08/03/2018 20:58:28	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLELeonorModeloFCF.pdf	07/03/2018 19:40:42	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Equipe.pdf	29/11/2017 08:37:46	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Andrea.pdf	06/09/2017 15:46:15	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia2_leonor.pdf	05/09/2017 19:42:09	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia1_leonor.pdf	05/09/2017 19:41:20	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Ramon.pdf	23/08/2017 14:34:48	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Luana.pdf	23/08/2017 14:30:55	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia_dep.pdf	23/08/2017 14:28:36	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Pj_colostro.pdf	23/08/2017 14:26:50	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_ass.pdf	22/08/2017 09:09:51	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros

HOSPITAL MATERNIDADE
LEONOR MENDES DE
BARROS - UGA IV

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da microbiota de recém - nascidos submetidos a colostroterapia
Pesquisador: Carla Taddei de Castro Neves
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 76151717.0.3001.0063
Instituição Proponente: Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.558.782

Apresentação do Projeto:
Projeto de pesquisa dentro dos padrões habituais de estilo.

Objetivo da Pesquisa:
O presente estudo tem como objetivo avaliar o estabelecimento da microbiota intestinal em neonatos prematuros submetidos à colostroterapia de origem direta (cru) e neonatos prematuros submetidos à colostroterapia proveniente do banco de leite (pasteurizado).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Projeto com riscos mínimos. Os benefícios advindos da pesquisa podem ajudar na escolha da colostroterapia a ser instituída.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Pesquisa relevante para a comunidade acadêmica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Este projeto de pesquisa encontra-se com alguns itens faltantes ou fora do padrão, portanto inserimos nas recomendações abaixo algumas alterações que poderiam melhorar o aspecto final do projeto.

Recomendações:
1 - Inserir os dados do CEP Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros no TCLE.

Endereço: Av. Celso Garcia 2477
Bairro: Belenzinho **CEP:** 03.015-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2292-4188 **Fax:** (11)2693-4736 **E-mail:** cep.leonor@gmail.com

2 - inserir no TCLE o tempo de duração da coleta das amostras e especificar quantas vezes serão coletadas.

3 - Na metodologia não consta que a pesquisa durará três anos, como está escrito no TCLE.

4 - incluir na metodologia que serão comparados os resultados das coletas entre os dois grupos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

SOLICITAMOS O ENVIO A ESTE CEP DE RELATÓRIOS SEMESTRAIS, DURANTE A REALIZAÇÃO DA PESQUISA, E O RELATÓRIO FINAL COM OS RESULTADOS OBTIDOS, CONFORME DETERMINA A RESOLUÇÃO Nº 466/12, ITEM II, SUBITENS II.19 E II.20.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.pdf	08/03/2018 20:59:07	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	08/03/2018 20:58:28	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLELeonorModeloFCF.pdf	07/03/2018 19:40:42	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Equipe.pdf	29/11/2017 08:37:46	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia2_leonor.pdf	05/09/2017 19:42:09	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia1_leonor.pdf	05/09/2017 19:41:20	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia_dep.pdf	23/08/2017 14:28:36	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Pj_colostro.pdf	23/08/2017 14:26:50	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 23 de Março de 2018

Assinado por:
Lucio Omar Carmignani
(Coordenador)

Endereço: Av. Celso Garcia 2477
Bairro: Belenzinho **CEP:** 03.015-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2292-4188 **Fax:** (11)2693-4736 **E-mail:** cep.leonor@gmail.com