



ARTIGO ORIGINAL

Breastfeeding increases microbial community resilience☆☆☆



Isabel I. Carvalho-Ramos^a, Rubens T.D. Duarte^b, Katia G. Brandt^c,
Marina B. Martinez^a e Carla R. Taddei^{a,d,*}

^a Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo, SP, Brasil

^b Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Florianópolis, SC, Brasil

^c Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Recife, PE, Brasil

^d Universidade de São Paulo (USP), Escola de Artes, Ciências e Humanidades, São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 15 de novembro de 2016; aceito em 17 de maio de 2017

KEYWORDS

Breastfeeding;
Intestinal microbiota;
Dendrogram analysis;
Microbial resilience;
Food;
Antibiotic

Abstract

Objective: Since the present group had already described the composition of the intestinal microbiota of Brazilian infants under low social economic level, the aim of the present study was to analyze the microbial community structure changes in this group of infants during their early life due to external factors.

Methods: Fecal samples were collected from 11 infants monthly during the first year of life. The infants were followed regarding clinical and diet information and characterized according to breastfeeding practices. DNA was extracted from fecal samples of each child and subjected to Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis.

Results: The results revealed a pattern of similarity between the time points for those who were on exclusive breastfeeding or predominant breastfeeding. Although there were changes in intensity and fluctuation of some bands, the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis patterns in the one-year microbial analysis were stable for breastfeeding children. There was uninterrupted ecological succession despite the influence of external factors, such as complementary feeding and antibiotic administration, suggesting microbiota resilience. This was not observed for those children who had mixed feeding and introduction of solid food before the 5th month of life.

Conclusion: These results suggested an intestinal microbiota pattern resilient to external forces, due to the probiotic and prebiotic effects of exclusive breastfeeding, reinforcing the importance of exclusive breastfeeding until the 6th month of life.

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2017.05.013>

☆ Como citar este artigo: Carvalho-Ramos II, Duarte RT, Brandt K, Martinez MB, Taddei CR. Breastfeeding increases microbial community resilience. J Pediatr (Rio J). 2018;94:258–67.

☆☆ Estudo feito na Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: crtaddei@usp.br (C.R. Taddei).

PALAVRAS-CHAVE

Aleitamento materno;
Microbiota intestinal;
Análise de
dendrograma;
Resistência
microbiana;
Alimentação;
Antibiótico

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Aleitamento materno aumenta a resiliência da comunidade microbiana**Resumo**

Objetivo: Como nosso grupo já havia descrito a composição da microbiota intestinal de neonatos brasileiros em baixo nível socioeconômico, o objetivo deste estudo foi analisar alterações estruturais da comunidade microbiana desse grupo de neonatos no início de sua vida devido a fatores externos.

Métodos: Amostras fecais foram coletadas mensalmente de 11 neonatos durante o primeiro ano de vida. Os neonatos foram acompanhados com relação a informações clínicas e nutricionais e caracterizados de acordo com práticas de amamentação. O DNA foi extraído das amostras fecais de cada criança e submetido a análise através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante.

Resultados: Os resultados revelaram um padrão de similaridade entre seus próprios pontos temporais em indivíduos em aleitamento materno exclusivo ou predominante. Apesar de variações na intensidade e flutuação de algumas bandas, o padrão Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante na análise microbiana de um ano foi estável em crianças em aleitamento materno. Houve sucessão ecológica ininterrupta apesar da influência de fatores externos, como alimentação complementar e administração de antibióticos, sugeriu resiliência da microbiota. Isso não foi observado nas crianças com alimentação heterogênea e introdução de alimentos sólidos antes do quinto mês de vida.

Conclusão: Nossos resultados sugerem um padrão de microbiota intestinal resiliente a forças externas, devido a efeitos probióticos e prebióticos do aleitamento materno exclusivo, reforçam a importância do aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A microbiota intestinal é um elemento-chave na saúde e na doença¹. É bem sabido que a composição da microbiota intestinal de recém-nascidos e crianças é influenciada pelo nascimento², pela dieta³, região geográfica e pelas influências ambientais.^{4,5}

Novos métodos de sequenciamento do *rRNA 16S*^{6,7} têm reescrito nosso entendimento sobre a relação entre as bactérias e o hospedeiro humano e o uso desses métodos para caracterizar a microbiota intestinal de neonatos e crianças que vivem em países desenvolvidos tem recebido cada vez mais atenção.^{3,8} Entretanto, poucos estudos feitos em países em desenvolvimento têm corroborado a observação global da variabilidade entre indivíduos,^{4,9} apesar das diferenças na composição da microbiota intestinal. Todos esses achados poderão contribuir para o entendimento mundial de como uma região geográfica juntamente com sua contaminação ambiental influencia ou não o estabelecimento da microbiota intestinal.

Em estudo anterior, descrevemos a composição da microbiota de um grupo de crianças que vivem em baixo nível socioeconômico no Brasil, caracterizada por baixas taxas de *Staphylococcus* em idades precoces¹⁰ e alta abundância de *Escherichia* aos 12 meses.⁵ Contudo, não havia informações sobre como a estrutura da comunidade microbiana muda no curto prazo devido a fatores externos.

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)¹¹ tem demonstrado que a dinâmica da diversidade

na comunidade microbiana intestinal pode ser avaliada para determinar diferenças na estrutura microbiana entre ambientes¹² e suas alterações com o passar do tempo.¹³ Neste estudo, analisamos a estrutura da comunidade microbiana desse grupo de crianças mensalmente durante o primeiro ano de vida com a DGGE.

Material e métodos**Indivíduos e amostras**

Analisamos um grupo de 11 crianças que vivem em baixo nível socioeconômico, descritas previamente.^{5,10} Os bebês nasceram por meio de parto normal no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP). Informações relativas à situação socioeconômica da família e condições sanitárias foram coletadas mensalmente durante as consultas médicas. A dieta da criança foi monitorada regularmente, com relação ao período de lactação e momento da introdução de novos alimentos. A ocorrência de infecções, complicações de saúde e o uso de medicação foram registrados. Amostras fecais foram coletadas de bebês nos primeiros dois dias, no sétimo dia e todo mês até o 12º mês de vida. As mães foram instruídas a coletar a amostra fecal imediatamente após a eliminação com uma colher esterilizada padronizada, colocá-la em um recipiente de plástico esterilizado e mantê-la em um freezer (-20°C) até a consulta algumas horas depois. As amostras foram transportadas durante todo o trajeto até o laboratório em um recipiente

de isopor cheio de gelo, numerado (tabela 1S – material complementar) e imediatamente armazenadas a -80°C até a extração do DNA, feita duas a três semanas após a coleta.

Práticas de amamentação

As crianças participantes deste estudo foram caracterizadas de acordo com práticas de amamentação, com base em Indicadores para Avaliar as Práticas do Aleitamento Materno,¹⁴ como segue: aleitamento materno exclusivo, para crianças que receberam apenas leite materno; aleitamento materno predominante, para aquelas que receberam leite materno, água e bebidas à base de água e sucos de frutas; e alimentação complementar, para aquelas que receberam leite materno e qualquer alimento, inclusive leite não materno (tabela 1). Além disso, de acordo com indicadores da OMS,¹⁴ o tempo recomendado para aleitamento materno exclusivo foi até o sexto mês de idade.

Extração do DNA

O DNA foi extraído das fezes com o mini kit QIAmp Stool DNA (Qiagen®, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído das fezes foi quantificado com um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific®, MA, EUA) e mantido a -20°C até ser usado.

Amplificação da PCR para DGGE

A reação da PCR para DGGE foi feita com iniciadores da região hipervariável V3 do gene *16S rRNA* (F338GC: 5'-CGC CCG GC CCG GGC CGC GGC GGC GGG GGC CGG GGG GCA GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' e R518: 5'-ATT GCT ACC GCG GG -3').¹⁵ A reação foi aprimorada para um volume final de 25 μL : tampão 1X, MgSO_4 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, iniciadores 0,2 mM, Hi-Fidelity Taq polimerase (Invitrogen®, CA, EUA) 0,1 U e DNA 20 ng. As reações foram feitas com o programa descrito por Muyzer et al.¹⁵

DGGE de amplicons de PCR

Os amplicons de PCR foram separados por DGGE com as especificações de Muyzer et al.¹⁵ e o sistema Decode (BioRad

Laboratories®, CA, EUA). O Bionumerics v.5.1 (Applied Maths®, Bélgica) foi usado para avaliação de perfis de diversidade de cada amostra, cálculo do coeficiente Dice e análise de agrupamento. Nossa análise considerou a presença/ausência de banda, a posição derivada do GC% de cada banda e a intensidade relativa das bandas para refletir a comunidade microbiana compartilhada e a abundância de cada população, respectivamente. O coeficiente de Bray-Curtis foi usado para criar matriz de similaridade entre cada amostra.¹⁶ Uma análise de agrupamento foi feita a partir da matriz de similaridade com Iniciador 6+.¹⁷ A correlação entre amostras e perfis de banda gerada pela DGGE foi determinada por análise de correspondência (AC) feita com o programa Canocov4.5 (Biometris®, Wageningen, Países Baixos). O biplot de AC foi construído com escala de distância entre espécies, na qual cada criança foi considerada uma amostra distinta e cada banda de DGGE foi considerada uma espécie única. Nenhum peso de amostra ou espécie foi especificado. Para tornar os dados visualmente mais claros, três grupos de perfis de DGGE foram criados para cada amostra: a) 0-5 meses; b) 6-11 meses; c) > 12 meses. Círculos de agrupamento foram automaticamente projetados pelo *software* Canoco para os três grupos de perfis. Para testar se o tipo de dieta influenciou a comunidade microbiana, as crianças foram agrupadas em aleitamento materno exclusivo (crianças 12, 13, 14 e 17) e complementar (crianças 1, 2, 3, 6, 7, 8, 15). A criança n° 3 foi incluída no grupo complementar para essa análise. A análise Permanova¹⁸ foi feita com a matriz de similaridade descrita acima. Foram feitas 999 permutações entre perfis de DGGE de crianças entre os dois grupos alimentares. Como o design não é equilibrado (número diferente de crianças em cada grupo), uma soma de quadrados Tipo III foi usada. O valor de p crítico foi ajustado pela correção Bonferroni para comparações múltiplas ($\alpha = 0,05$; valor de p crítico ajustado = $0,005$).

Considerações éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do HU-USP (número de registro 574/05). Todas as mães participantes da pesquisa assinaram um formulário de consentimento informado.

Tabela 1 Informações clínicas sobre uso de antibióticos e práticas de amamentação (Modificado de Taddei et al.⁵)

Criança n°	Sexo	Uso de antibióticos (período)	Prática de amamentação ^a
1	F	Amoxicilina (9° mês – 7 dias)	Alimentação complementar
2	F	NÃO	Alimentação complementar
3	F	Cefalexina (1° mês – 7 dias)	Aleitamento materno predominante
6	M	Amoxicilina (7° mês – 10 dias)	Alimentação complementar
7	F	NÃO	Alimentação complementar
8	F	Amoxicilina (5° mês – 10 dias)	Alimentação complementar
12	M	Amoxicilina (2° e 9° meses – 7 dias)	Aleitamento materno exclusivo
13	M	NÃO	Aleitamento materno exclusivo
14	M	Amoxicilina (9° mês – 10 dias)	Aleitamento materno exclusivo
15	M	Cefalexina (10° mês – 10 dias)	Alimentação complementar
17	M	Amoxicilina (6° mês – 10 dias)	Aleitamento materno exclusivo

^a De acordo com indicadores da OMS para avaliação de práticas de aleitamento materno.¹³

Resultados

Informações clínicas

Das 11 crianças participantes do estudo, quatro tinham uma dieta caracterizada como aleitamento materno exclusivo até o sexto mês. Uma criança tinha uma dieta caracterizada como aleitamento materno predominante até o sexto mês, com introdução de chá com mel no terceiro mês, e seis tiveram uma dieta caracterizada como alimentação complementar até o quinto mês (tabela 1), com a introdução de leite não materno, frutas e iogurte no terceiro e quarto mês. No sexto mês, a maioria das crianças comia alimentos macios, como sopa, frutas, sucos de frutas e iogurte. No fim do 12º mês de vida, todas as crianças tinham uma dieta sólida diversificada, com carne, grãos (arroz, leguminosas, ervilhas e lentilhas), farinha de trigo, fibras (verduras), frutas, leite (fórmula e/ou leite materno) e iogurte. Sete delas receberam um antibiótico para infecção respiratória durante o período do estudo (tabela 1).

Análise molecular da microbiota de neonatos por DGGE

O DNA fecal de cada criança foi extraído e a região V3 variável do gene *16S rRNA* foi amplificada. Fizemos a análise de agrupamento de todos os pontos temporais de todas as crianças para encontrar alguma correlação (fig. 1S – material complementar). Não foi possível correlacionar algum padrão de similaridade com a prática de amamentação ao se analisar o dendograma. Assim, cada perfil de DGGE foi submetido a análise de agrupamento e um dendograma foi obtido para cada criança (não constam dados). Os resultados individuais revelaram um aumento em bandas ao longo dos meses, indicaram um aumento na diversidade e complexidade da microbiota e diferenças entre indivíduos em perfis de DGGE, sem um padrão único observado em todas as crianças.

Contudo, o perfil de PCR-DGGE de cada criança revelou um padrão de similaridade interessante entre os pontos temporais dos indivíduos em aleitamento materno exclusivo ou predominante (fig. 1). O perfil de microbiota dessas crianças apresentou uma persistência de bandas proeminentes mesmo após desmame e/ou introdução de alimentos sólidos, além de um aumento gradual no número de bandas ao longo do tempo, sugeriu uma sucessão ecológica. Isso não foi observado nas crianças com alimentação heterogênea e introdução de alimentos sólidos antes do quinto mês (fig. 2), nas quais um perfil variado foi observado, sem semelhanças no mesmo ponto temporal. A análise Permanova, ao comparar aleitamento materno exclusivo e complementar, revelou diferenças significativas entre esses grupos ($p = 0,004$; valor de p crítico ajustado = $0,005$). De acordo com esse resultado, a comunidade microbiana de cada grupo de amamentação é diferente em um nível de confiança de 95%.

Aleitamento materno exclusivo

O perfil de DGGE de crianças em aleitamento materno exclusivo mostrou perfil microbiano caracterizado por um padrão

de bandas estável, com bandas comuns durante o período do estudo, com um ligeiro aumento ou redução na intensidade (fig. 1 A-D), mesmo durante a influência de fatores externos, como a introdução de alimentos sólidos ou administração de antibióticos. Nas primeiras semanas de vida, algumas bandas desapareceram nos meses subsequentes, porém, depois, um padrão foi estabelecido, com um aumento em bandas, indicou um aumento na diversidade. Após a introdução de alimentos sólidos na dieta, o perfil da banda mudou, com o desaparecimento de algumas bandas, e o aparecimento de outras, apesar de as bandas proeminentes terem permanecido sem diferenças na intensidade, sugeriu uma sucessão ecológica e um aumento na diversidade.

As crianças nº 12, 13, 14 e 17 receberam aleitamento materno exclusivo até o sexto mês e comidas macias e sucos de frutas foram introduzidos durante esse mês. Apenas a criança nº 13 não recebeu antibiótico, enquanto as outras receberam antibiótico uma ou duas vezes para tratar infecções respiratórias superiores (tabela 1). Para crianças que receberam antibióticos, a diversidade foi reduzida e houve uma flutuação na intensidade das bandas no mês seguinte à administração de medicamentos. Contudo, o perfil microbiano permaneceu estável e a diversidade aumentou nos meses subsequentes.

Apesar de variações na intensidade e flutuação de algumas bandas, o padrão DGGE na análise microbiana de um ano foi estável em neonatos amamentados. Houve sucessão ecológica com introdução de alimentos ou administração de antibióticos, sem perder a comunidade microbiana, sugeriu resistência da microbiota. Essa evolução também foi refletida na AC. Uma sucessão ecológica foi observada após a introdução de alimentos na alimentação de todos esses neonatos e no sexto mês, com uma mudança no perfil microbiano, e após o 12º mês a comunidade microbiana pareceu ter sido preservada (fig. 3A)'.

Aleitamento materno predominante

O perfil de DGGE nessa dieta foi semelhante ao observado no aleitamento materno exclusivo. Apenas uma criança (nº 3) apresentou uma dieta caracterizada como aleitamento materno predominante, com introdução de chá com mel no terceiro mês (fig. 1E). Essa criança apresentou infecção de pele no sétimo dia de vida¹⁰ e foi tratado com cefalexina por 10 dias. O perfil de DGGE mostrou uma redução em bandas nos meses seguintes à administração de antibióticos, com uma recuperação de diversidade no quinto mês com um padrão evidente da comunidade microbiana. A introdução de comida macia no sexto mês pareceu não alterar esse padrão e a estrutura da comunidade foi observada até o fim do período do estudo. Mesmo a introdução de chá não afetou esse padrão. Esse perfil também foi observado na AC, que indicou alteração da estrutura da comunidade microbiana após o quinto mês (fig. 3A).

Alimentação complementar

Os perfis de DGGE observados nas crianças sem aleitamento materno exclusivo (fig. 2) indicaram uma flutuação em bandas sem restauração do padrão microbiano inicial. Elas apresentaram uma alimentação heterogênea no segundo

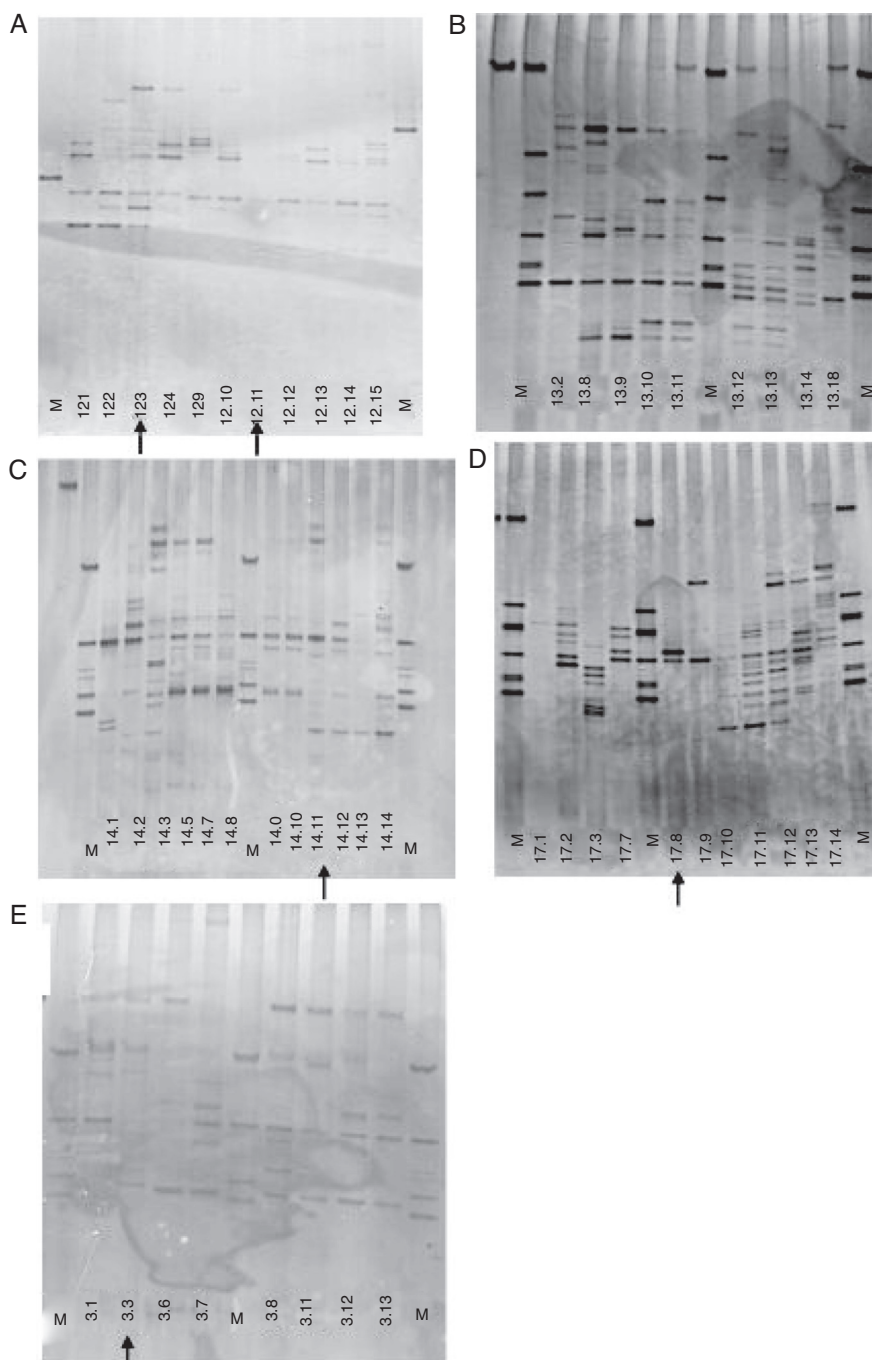


Figura 1 Perfis PCR-DGGE de crianças em aleitamento materno exclusivo (A-D) e predominante (E). A, criança n° 12; B, criança n° 13, C, criança n° 14, D, criança n° 17; E, criança n° 3. A administração de antibióticos é indicada por setas.

mês e alimentos sólidos foram introduzidos no terceiro ou quarto mês. O perfil de DGGE não mostrou um padrão de sucessão ecológica como observado nas crianças descritas acima, porém uma flutuação em bandas ao longo do período do estudo. Houve aumento em bandas ao longo do tempo em uma maior proporção do perfil comparado com crianças em aleitamento materno; contudo, a estrutura da comunidade microbiana não foi preservada e nenhum padrão poderia ser identificado. As crianças que recebiam alimentação complementar eram n° 1, 2, 6, 7, 8 e 15. Apenas as crianças n° 2 e

7 não receberam antibiótico durante o período do estudo e, mesmo assim, os perfis de DGGE foram dispersos sem um padrão definido. Para as crianças que receberam antibióticos, o número de bandas no perfil de DGGE diminuiu durante o período de administração de antibióticos (fig. 2) e um aumento em bandas foi observado nos meses subsequentes, porém com uma comunidade microbiana diferente. A AC mostrou uma mudança no perfil microbiano após a introdução de leite não materno ou alimentos macios antes do sexto mês, alterou a comunidade microbiana (fig. 3B).

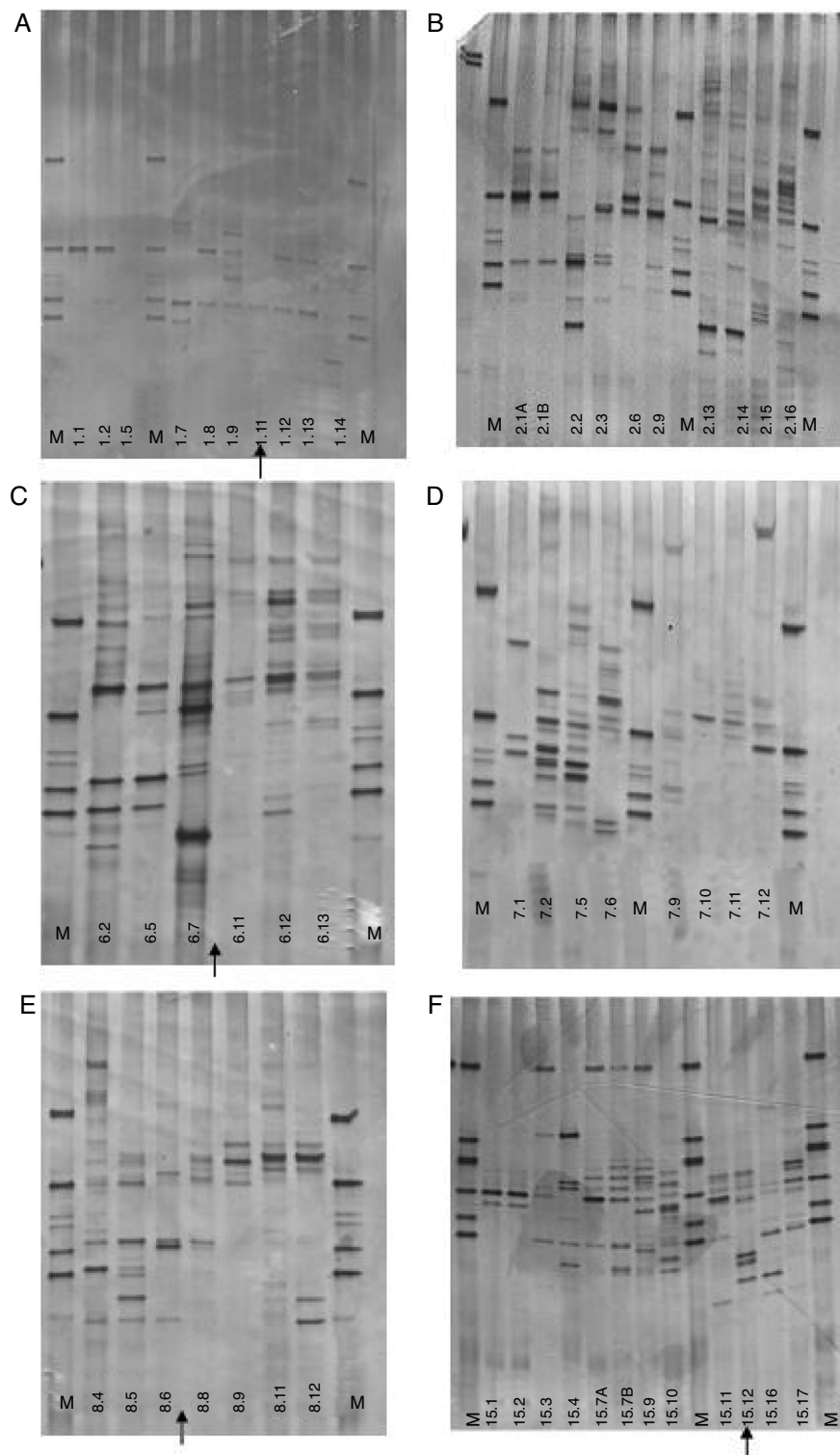


Figura 2 Perfis de PCR-DGGE de crianças em aleitamento materno complementar: crianças nº 1, nº 2, nº 6, nº 7, nº 8 e nº 15. A administração de antibióticos é indicada por setas.

Discussão

Nosso grupo já havia descrito, com a construção da biblioteca de qPCR e 16S rRNA, a composição de microbiota intestinal desse grupo de crianças em alguns pontos durante seu primeiro ano de vida.^{5,10} No presente estudo, contudo,

a estrutura da comunidade microbiana foi analisada mensalmente, revelou uma visão mais detalhada dessas alterações ao longo do tempo.

A análise de dendrograma não mostrou correlação entre o perfil de agrupamento e a prática de amamentação, pois houve diferenças entre indivíduos entre as crianças,

conforme discutido anteriormente.⁵ Por outro lado, a análise do perfil do indivíduo permitiu uma interpretação mais clara da estrutura da comunidade microbiana intestinal, mostrou um aumento em bandas ao longo dos meses, indicou um aumento na diversidade e na complexidade da microbiota, conforme discutido anteriormente.^{3,5,19}

A resiliência bacteriana foi descrita como a taxa em que a composição microbiana retorna à sua composição original após ser alterada,²⁰ devido a características fisiológicas

e mecanismos de adaptação no novo ambiente. Caso a abundância fosse reduzida por uma alteração, algum grupo de bactérias poderia beneficiar-se de novas condições e então aumentar em abundância e restaurar a composição original.²⁰

A análise de resultados de DGGE desse grupo de crianças revelou um perfil interessante de resiliência da comunidade microbiota em crianças alimentadas exclusivamente com leite materno, justificado pela análise Permanova,

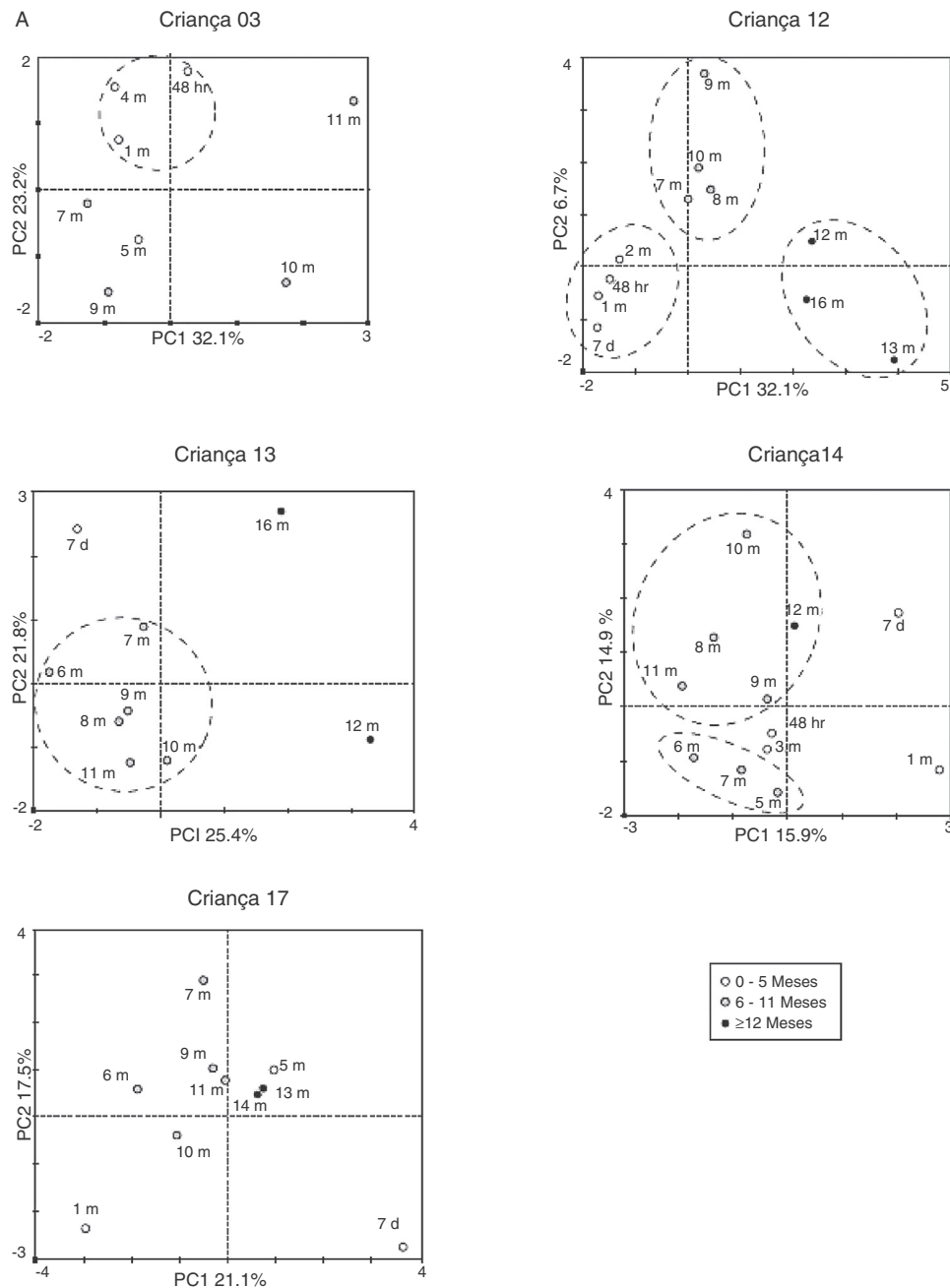


Figura 3 AC da comunidade microbiana intestinal ao longo do tempo de cada criança em aleitamento materno: A, exclusivo (crianças n° 12, n° 13, n° 14 e n° 17) e predominante (criança #3). B, alimentação complementar.

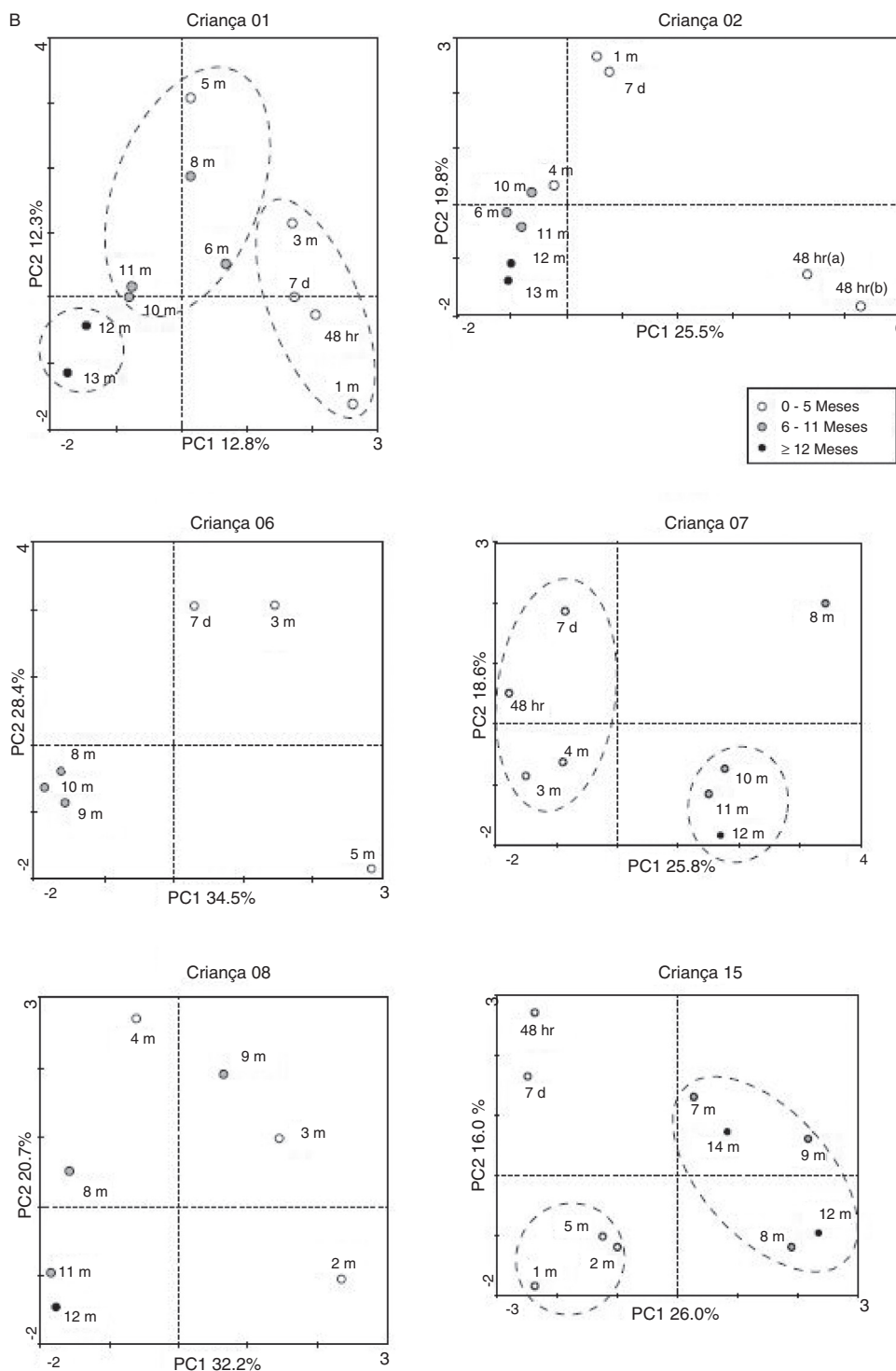


Figura 3 (Continuação).

nas quais o perfil microbiota foi diferente daquelas com alimentação complementar ($p < 0,005$). As crianças n° 12, n° 13, n° 14 e n° 17 receberam aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida e, após a introdução de alimentos sólidos e/ou administração de antibióticos, observamos um aumento no número de bandas, sugeriu um aumento na diversidade microbiana. Ademais, os padrões de

DGGE não foram alterados e uma estrutura da comunidade foi compartilhada em cada criança, como observado pela AC. Apesar do impacto na diversidade do gênero bacteriano, a introdução de alimentos sólidos e/ou administração de antibióticos teve pouco efeito na estrutura da comunidade bacteriana, mostrou evidência de resiliência da microbiota.

O aleitamento materno é reconhecido universalmente como a maneira ideal de alimentar neonatos com uma fonte completa de nutrição,²¹ além de reduzir efetivamente a morbidez e a mortalidade por diarreia e de outras doenças infecciosas.²²

O leite materno é uma fonte de bactérias simbióticas e probióticas²³ e prebióticos²⁴ para o intestino do bebê, como oligossacarídeos do leite materno (HMO). HMO não são digeridos pelo intestino humano e, para tanto, o papel da microbiota intestinal é fundamental para sua hidrólise.²⁴ Dessa forma, HMO aumentam a população de bactérias benéficas pelos efeitos tanto probióticos quanto prebióticos e, conseqüentemente, a microbiota intestinal de neonatos é dominada *bifidobactérias* e lactobacilos.^{25,26}

A introdução de alimentos sólidos na dieta das crianças provoca uma grande mudança na diversidade da microbiota intestinal.^{13,27,28} No fim do sexto mês, todas as crianças tinham uma dieta sólida diversificada, que incluía carne, grãos (arroz, leguminosas, ervilhas e lentilhas), farinha de trigo, fibras (verduras), frutas, leite (fórmula e/ou leite materno) e iogurte.⁵ Os padrões DGGE das crianças estudadas mostraram um aumento em bandas, sugeriram também um aumento na diversidade da microbiota. Em crianças com alimentação complementar, o perfil de DGGE mostrou uma flutuação em bandas durante o período estudado, além de nenhum compartilhamento de bandas comuns de acordo com a AC, corroborou os resultados da DGGE. Adicionalmente, a introdução precoce de alimentos sólidos na dieta do bebê pareceu estar associada à instabilidade na comunidade microbiota.

A criança n° 3 tinha uma dieta caracterizada como aleitamento materno predominante com a introdução de chá com mel no terceiro mês, foi amamentada com leite materno até o sexto mês. O padrão DGGE foi semelhante ao de crianças em aleitamento materno exclusivo e o chá com mel não pareceu alterar a ecologia microbiana ao longo do tempo. Apesar da alteração da riqueza microbiana,¹⁰ a administração de antibióticos não afetou a resistência microbiana, como evidenciado ainda em crianças em aleitamento materno exclusivo.

A administração de antibióticos também é outro fator externo que tem um impacto negativo sobre a diversidade da microbiota intestinal,^{5,29} com uma perturbação da resistência da microbiota.³⁰ Contudo, as três crianças (n° 12, n° 14 e n° 17) que receberam antibióticos orais mostraram uma redução na diversidade bacteriana sem alteração da comunidade microbiana intestinal. A comunidade microbiana pareceu ser restaurada no mês subsequente à administração de antibióticos.

O perfil de DGGE da criança n° 14 demonstrou um aumento marcado na diversidade microbiana após a introdução de alimentos sólidos, com restauração da diversidade após a administração de antibióticos. Contudo, a estrutura da comunidade não foi alterada e a AC mostrou um padrão de bandas compartilhadas sem alterações. Curiosamente, o quadro médico dessa criança indicou uma queda na curva de crescimento após o sexto mês, com sinais de desnutrição ao longo do tempo. Essa criança era menos alimentada devido a fatores socioeconômicos e a mãe substituiu a comida pelo leite materno, o que

poderia explicar a redução na diversidade microbiana e a manutenção da resiliência da microbiota.

O perfil microbiano da criança n° 17 foi indicado por uma flutuação em bandas e pareceu gerar uma microbiota com um novo perfil, embora tenha se agrupado a outras amostras que compartilharam as mesmas bandas, sugeriu resiliência da microbiota. Existe a possibilidade de essa alteração ter ocorrido em virtude da administração de antibióticos concomitante com a introdução de alimentos sólidos. Os efeitos de antibióticos na microbiota não permitiram que novas bactérias de alimentos ou efeitos prebióticos de alimentos produzissem alterações na microbiota do sexto ao décimo mês de vida.

Em nossos estudos anteriores que envolveram esse grupo de crianças brasileiras,^{5,10,25} demonstramos uma ausência notável de *Staphylococcus* como colonizadora intestinal¹⁰ e uma abundância de *E. coli*⁵, corroborou o conhecimento mundial da importância da influência de fatores externos na colonização da microbiota intestinal. Essas crianças tinham uma dieta à base de leite e a microbiota intestinal era dominada por *bifidobactérias* e lactobacilos.²⁵ Contudo, em nove desses estudos, foi possível associar perfis específicos ou alterações na composição da microbiota com aleitamento materno exclusivo.

Com a DGGE, determinamos a estrutura da comunidade microbiana intestinal durante o primeiro ano de vida das crianças estudadas e os resultados sugeriram a resiliência do padrão da microbiota intestinal a forças externas, aqui representadas pela administração de antibióticos e a introdução de alimentos sólidos. A manutenção de uma comunidade bacteriana estável no intestino de neonatos poderá proporcionar efeitos de eubiose na saúde ao longo dos anos seguintes. Do nascimento ao período de desmame, o leite materno é a única fonte de nutrição recomendada pela OMS.¹⁴ No melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro relatório que mostra a associação entre o aleitamento materno exclusivo e a resiliência da comunidade microbiana, reforça a importância do aleitamento materno exclusivo até o sexto mês, conforme recomendado pela OMS.¹⁴

Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) n° 06/55141-4 para MBM e n° 11/51196-7 para CRT.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

O Dr. A. Leyva fez a edição em inglês do manuscrito.

Apêndice. Material adicional

Pode-se consultar o material adicional para este artigo na sua versão eletrônica disponível em [doi:10.1016/j.jped.2017.05.013](https://doi.org/10.1016/j.jped.2017.05.013).

Referências

1. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90:859–904.
2. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborn. *PNAS*. 2010;107:11971–5.
3. Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology*. 2011;157:1385–92.
4. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS*. 2010;107:14691–6.
5. Taddei CR, Oliveira FF, Duarte RT, Talarico ST, Takagi EH, Ramos Carvalho II, et al. High abundance of *Escherichia* during the establishment of fecal microbiota in Brazilian children. *Microb Ecol*. 2014;67:624–34.
6. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res*. 2005;15:1767–76.
7. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of *16S rRNA* diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS*. 2011;108:4516–22.
8. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ*. 2013;185:385–94.
9. Lin A, Bik EM, Costello EK, Dethlefsen L, Haque R, Relman DA, et al. Distinct distal gut microbiome diversity and composition in healthy children from Bangladesh and the United States. *PLoS ONE*. 2013;8:e53838.
10. Brandt K, Taddei CR, Takagi EH, Oliveira FF, Duarte RT, Irino I, et al. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. *Clinics*. 2012;67:113–23.
11. Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods*. 2004;56:297–314.
12. Dehingia M, Devi KT, Talukdar NC, Talukdar R, Reddy N, Mande SS, et al. Gut bacterial diversity of the tribes of India and comparison with the worldwide data. *Sci Rep*. 2015;22:18563.
13. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in humans neonates. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:219–26.
14. World Health Organization (WHO). Indicators for assessing infant and young child feeding practices. Part I: Definition. Geneva: WHO; 2008.
15. Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for *16S rRNA*. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59:695–700.
16. Suchodolski JS, Ruaux CG, Steiner JM, Fetz K, Williams DA. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4702–8.
17. Clarke KR, Gorley RN. PRIMER v6: user manual/tutorial. Plymouth: PRIMER-E; 2006.
18. Anderson M, Ter Braak CJ. Permutation tests for multi-factorial analysis of variance. *J Stat Comput Simul*. 2003;73:85–113.
19. Scholtens PA, Oozeer R, Martin R, Ben Amor K, Knol J. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012;3:425–47.
20. Allison SD, Martiny JB. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *PNAS*. 2008;105:11512–9.
21. González-Chica DA, Gonçalves H, Nazmi A, Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, et al. Seasonality of infant feeding practices in three Brazilian birth cohorts. *Int J Epidemiol*. 2012;41:743–52.
22. German JB, Dillard CJ, Ward RE. Bioactive components in milk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5:653–8.
23. Martín R, Jimenez E, Heilig H, Fernandez L, Marín ML, Zoetendal EG, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:965–9.
24. Barile D, Rastall RA. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24:214–9.
25. Talarico ST, Santos FE, Brandt K, Martinez MB, Taddei CR. Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. *Clinics*. 2017;72:154–60.
26. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51:77–84.
27. Roger LC, Mccartney AL. Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence *in situ* hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbiology*. 2010;156:3317–28.
28. Nielsen S, Nielsen DS, Lauritzen L, Jakobsen M, Michaelsen KF. Impact of diet on the intestinal microbiota in 10-month-old infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44:613–8.
29. Tanaka S, Kobayashi T, Songjinda P, Tateyama A, Tsubouchi M, Kiyohara C, et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;56:80–7.
30. Gibson MK, Pesesky MW, Dantas G. The yin and yang of bacterial resilience in the human gut microbiota. *J Mol Biol*. 2014;426:3866–76.