

ASSOCIAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA DE RECÉM-NASCIDOS E A IDADE GESTACIONAL

Beatriz Midori Takagaki¹

Anderson Santos de Freitas²

Luiz Fernando Wurdig Roesch³

Resumo:

Muitos trabalhos recentes relatam a não esterilidade do útero, sugerindo uma colonização do feto antes do seu nascimento. Independentemente disso, a primeira excreção do recém-nascido, também chamada mecônio, está relacionada à microbiota materna, sendo proveniente do cordão umbilical, das microbiotas intestinal e vaginal da mãe e até mesmo do líquido amniótico deglutido. Estes microrganismos adquiridos desempenham importante papel na formação e regulação das funções nutricionais, imunológicas e neuronais, sendo determinantes para a suscetibilidade a doenças futuras. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a comunidade microbiana do mecônio de recém-nascidos e verificar a influência da idade gestacional na diversidade bacteriana do mecônio. Foi isolado DNA microbiano a partir de 102 amostras de mecônio de bebês nascidos entre a 28^a a 41^a semana de gestação, coletados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada e sequenciada usando a plataforma Ion PGM. As sequências geradas foram processadas seguindo as recomendações do Brazilian Microbiome Project e agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com 97% de similaridade. Um total de 2.206.608 sequências de alta qualidade foram obtidas. Elas foram agrupadas em 32.899 UTOs. Análises de diversidade alfa mostraram uma menor abundância de UTOs no mecônio de crianças nascidas no nono mês de gestação, mas a comunidade microbiana do mecônio de crianças nascidas entre a 28^a e 41^a semana de gestação não se mostrou significativamente diferente ($p > 0,05$). O mecônio se mostrou quase inteiramente composto pelos filos Proteobacteria (com uma frequência total de 47,9%), Bacteroidetes (22,6%) e Firmicutes (17,1%). UTOs identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Prevotella* foram as mais abundantes, com uma média total por amostra de 17,6% e 12,6%, respectivamente. Tendo isso em vista, nossos dados indicaram que a composição microbiana do mecônio de recém-nascidos não se alterou da 28^a para a 41^a semana de gestação, mas foi observada uma menor abundância de UTOs em crianças nascidas no nono mês de gestação.

Palavras-chave: 16S rRNA, Diversidade microbiana, Mecônio, Terceiro trimestre de gestação

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

ASSOCIAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA DE RECÉM-NASCIDOS E A IDADE GESTACIONAL

¹ Aluno de graduação. biah.midori@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. andersonsf234@gmail.com. Co-autor

³ Docente. luizroesch@unipampa.edu.br. Orientador

ASSOCIAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA DE RECÉM-NASCIDOS E A IDADE GESTACIONAL

1 INTRODUÇÃO

Há muitas controvérsias quanto à esterilidade do recém-nascido (ANTONOWICZ; SHWACHMAN, 1979; JIMÉNEZ et al., 2008). No entanto, muitos trabalhos recentes já sugerem que ele é colonizado antes mesmo do nascimento (MOLES et al., 2013), contrariando a ideia de colonização apenas no momento do parto e à medida em que bebê entra em contato com o meio externo (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999). Independente disso, a microbiota do mecônio (primeira excreção do recém-nascido) está intimamente ligada à microbiota materna, podendo ser influenciada tanto quantitativamente quanto qualitativamente (JIMÉNEZ et al., 2008). As fontes de micro-organismos possivelmente vem do cordão umbilical, da microbiota intestinal e vaginal da mãe e até mesmo do líquido amniótico deglutido (COLLADO et al., 2016; STINSON; PAYNE; KEELAN, 2017). Estes microrganismos adquiridos no sistema gastro-intestinal desempenham importante papel na formação e regulação das funções nutricionais, imunológicas e até mesmo neuronais (DI MAURO et al., 2013; STINSON; PAYNE; KEELAN, 2017). Por isso, é importante entender a composição inicial do intestino dos bebês, pois são eles serão importantes para determinar a saúde da criança futuramente, sendo possível modular essa microbiota em caso de colonização indesejada (SCHMIDT; RAES; BORK, 2018).

Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho foi avaliar a comunidade microbiana do mecônio de recém-nascidos e verificar a influência da idade gestacional na diversidade bacteriana do mecônio.

2 METODOLOGIA

A amostragem deste estudo foi realizada na seção de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), região sul do Brasil. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Foram coletadas um total de 102 amostras de mecônio de bebês nascidos entre 28^a a 41^a semanas de gestação. As amostras foram armazenadas imediatamente após a coleta em nitrogênio líquido até o momento da extração. O DNA microbiano foi isolado utilizando o kit QIAamp Fast DNA Stool Mini (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos), seguindo instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi determinada pelo espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare, Chicago, IL, Estados Unidos). A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada por PCR e sequenciada usando o PGM Ion Torrent (Thermo Fischer Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos) com iniciadores universais para bactérias/arqueias 515F e 806R (CAPORASO et al., 2012). As sequências geradas foram processadas seguindo as recomendações do “Brazilian Microbiome Project” (PYLRO et al., 2014) e agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com 97% de similaridade. A classificação taxonômica foi realizada no QIIME (CAPORASO et al., 2010), tendo como base o banco de dados Greengenes 13.5 (MCDONALD et al., 2012).

As análises de alfa e beta diversidade foram processadas no ambiente do R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008) usando o pacote “phyloseq” (MCMURDIE; HOLMES, 2013). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para determinar diferenças nas diversidades, seguido do teste *post hoc* de Dunn para definir quais grupos se diferiam entre si. Uma análise de variância multivariada permutacional (perMANOVA) foi aplicada a partir da função Adonis, disponível no pacote “Vegan” (OKSANEN et al., 2015), para determinar se havia diferença na comunidade microbiana dos recém-nascidos e controlar

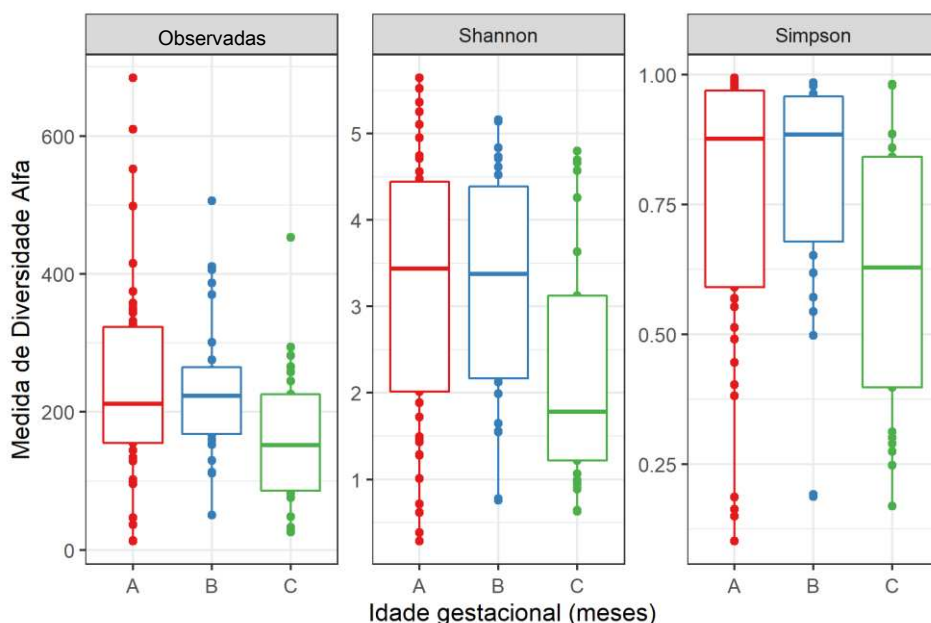
variáveis que poderiam afetar nas análises. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o sequenciamento foram geradas um total de 2.206.608 sequências de alta qualidade, agrupadas em 32.899 UTOs. Para o processamento das análises, o número de sequências por amostra foi normalizado para possibilitar uma comparação equivalente.

O número de UTOs observadas apresentou-se semelhante em todos os meses de gestação avaliados. Em relação à abundância e dominância de UTOs, crianças nascidas no sétimo e oitavo mês apresentaram-se bem semelhantes ($p>0,05$), enquanto que, crianças nascidas no nono mês diferiram das crianças nascidas no sétimo mês ($p<0,05$), apresentando índices menores de Shannon e Simpson (Figura 1).

Figura 1- Medidas de diversidade alfa de comunidades microbianas em mecônio de bebês nascidos entre a 28ª e 41ª semana de gestação. Os painéis representam as UTOs observadas, índice de Shannon e o índice de Simpson respectivamente da esquerda para direita. As caixas abrangem o primeiro ao terceiro quartil; a linha horizontal dentro das caixas representa a mediana. A linha vertical que ultrapassa as caixas indica variabilidade fora dos quartis inferior e superior e os pontos indicam valores discrepantes (*outliers*). Caixas vermelhas correspondem à bebês nascidos no 7º mês (A); caixas azuis aos bebês nascidos no 8º mês (B) e caixas verdes os bebês nascidos no 9º mês (C).



Fonte: do autor, 2018.

Os resultados da perMANOVA para controle de variáveis estão apresentados na Tabela 1. Dentre as variáveis analisadas, apenas o tipo de nascimento (pré-termo e termo) influenciou significativamente na composição da comunidade microbiana do mecônio dos recém-nascidos. A comunidade microbiana presente em cada um dos três últimos meses de gestação não se apresentou significativamente diferente ($p>0,05$), mas é possível ver uma semelhança maior entre as crianças nascidas no sétimo e oitavo mês (Figura 2), corroborando achados da alfa diversidade.

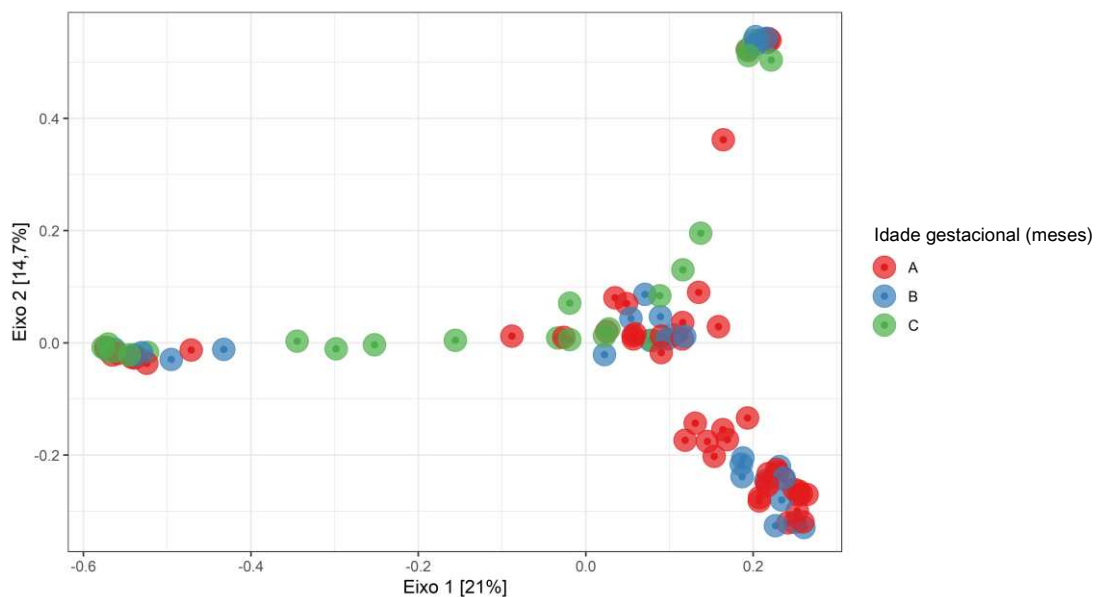
Tabela 1 - Análise Permutacional de Variância (perMANOVA) das dissimilaridades de Bray-Curtis para a estrutura da comunidade de UTO bacteriana usada para a detecção de possíveis variáveis de confusão.

Variáveis de confusão	R ²	Valores de p
Antibiótico intraparto	0,011	0,269
Sexo (feminino, masculino)	0,009	0,481
Infecção por <i>Estreptococos</i>	0,037	0,56
Modo de nascimento (parto normal, cesariana)	0,007	0,71
Tipo de nascimento (pré-termo, termo)	0,034	0,002

Valores significativos são destacados em negrito. Valores p são baseados em 999 permutações.

Fonte: do autor, 2018.

Figura 2- Comunidade microbiana do mecônio de bebês nascidos entre a 28^a e 41^a semana de gestação expressa por PCoA, utilizando distância Bray-Curtis. Pontos vermelhos indicam bebês nascidos no 7^o mês (A); pontos azuis os bebês nascidos no 8^o mês (B) e pontos verdes os bebês nascidos no 9^o mês (C).



Fonte: do autor, 2018.

Proteobacteria, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* foram os filos mais abundantes ao longo do terceiro trimestre de gestação, totalizando mais de 87% da comunidade microbiana do mecônio dos recém-nascidos, sendo *Proteobacteria* responsável por quase 50% desta porcentagem total. Esse filo já foi reportado como mais abundante na microbiota do mecônio de recém-nascidos (HU et al., 2013). UTOs pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Prevotella* mostraram os mais abundantes, com uma média total por amostra de 17,6% e 12,6%, respectivamente. Outras UTOs que obtiveram frequência total média maior que 2,6% foram *Burkholderia*, *Streptococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Staphylococcus*, *Bradyrhizobium*, *Bacteroides* e *Phenylobacterium*. Esses gêneros já foram descritos presentes na microbiota oral, vaginal e intestinal materna, bem como na placenta e fluido amniótico (STINSON; PAYNE; KEELAN, 2017).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aqui foram relatadas as principais UTOs presentes no mecônio de neonatos nascidos entre a 28^a e 41^a semana de gestação. A comunidade microbiana não se mostrou significativamente diferente entre os 3 últimos meses de gestação, mas a abundância das UTOs de crianças nascidas no nono mês mostrou-se menor se comparado com as outras crianças, sendo que crianças nascidas entre o sétimo e oitavo mês de gestação se apresentaram semelhantes entre si. Já foi mencionado na literatura que o funcionamento cognitivo em bebês foi diminuído com o aumento da diversidade microbiana (DINAN; CRYAN; STANTON, 2018). A maior abundância de UTOs aqui encontrada em pré-termos pode ser um reflexo desse efeito. Por isso, é interessante ampliar essas análises com a microbiota fecal desses recém-nascidos para acompanhar a sucessão microbiana e possíveis alterações sofridas, assim como identificar marcadores que representem estados de saúde e doença em bebês.

REFERÊNCIAS

- ANTONOWICZ, I.; SHWACHMAN, H. Meconium in health and in disease. **Advances in Pediatrics**, v. 26, p. 275–310, 1979.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, maio 2010.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, ago. 2012.
- 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, p. 23129, 22 mar. 2016.
- DI MAURO, A. et al. Gastrointestinal function development and microbiota. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 39, p. 15, 24 fev. 2013.
- DINAN, T. G.; CRYAN, J. F.; STANTON, C. Gut Microbes and Brain Development Have Black Box Connectivity. **Biological Psychiatry**, Early Life Environments and Later Vulnerabilities. v. 83, n. 2, p. 97–99, 15 jan. 2018.
- HU, J. et al. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e78257, 2013.
- JIMÉNEZ, E. et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Research in Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 187–193, abr. 2008.
- MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 1035S–1045S, 1999.
- MCDONALD, D. et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 610–618, mar. 2012.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.

MOLES, L. et al. Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66986, 28 jun. 2013.

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, 1 dez. 2014.

SCHMIDT, T. S. B.; RAES, J.; BORK, P. The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1198–1215, 8 mar. 2018.

STINSON, L. F.; PAYNE, M. S.; KEELAN, J. A. Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 352–369, 4 maio 2017.