

Sara Barbosa Leite Nunes

Microbiota do leite materno: origem e benefícios

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Sara Domingues e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Sara Barbosa Leite Nunes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2008011273, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo desta Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia deste trabalho, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, de de 2014.

(Sara Barbosa Leite Nunes)

A Tutora

Sara Domingues

(Professora Doutora Sara Domingues)

A aluna

Sara Nunes

(Sara Barbosa Leite Nunes)

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e a todos os professores que contribuíram para a minha formação,

Aos meus amigos pela cumplicidade, amizade, paciência, apoio e por todos os momentos partilhados durante estes anos,

Aos meus pais, por tudo o que me ensinaram a ser e por tudo o que eles são,

Aos meus irmãos, pelas palavras de incentivo e motivação,

A Coimbra, e a tudo o que ela encerra,

Sara

Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

BALs - Bactérias ácido-lácticas

CDs - Células dendríticas

EN - Enterocolite necrosante

GOs - Galacto-oligossacarídeos

IMC - Índice de massa corporal

LM - Leite materno

RN(s) - Recém-nascido(s)

OMS - Organização Mundial de Saúde

Th1 - Linfócitos T auxiliares

Th2 - Linfócitos T auxiliares

TGF- β - Fator de transformação de crescimento β

UFC - Unidades formadoras de colónias

Índice

Resumo.....	3
Abstract	4
1.Introdução	5
2. Leite materno	7
2.1. Tipos de leite materno	7
2.2.Composição bacteriana do leite materno.....	8
2.3. Origem das bactérias do leite materno.....	9
2.4.Fatores que influenciam a composição bacteriana do leite materno.....	11
3. Importância da microbiota do leite materno.....	12
3.1. Amamentação e colonização intestinal.....	12
3.2. Impacto e significado da microbiota do leite materno	14
4. Benefícios do leite materno a curto e a longo prazo	15
4.1. Mecanismos de ação da microbiota intestinal.....	15
4.1.1. Exclusão competitiva.....	16
4.1.2. Barreira intestinal.....	16
4.1.3. Produção de compostos antimicrobianos.....	17
4.1.4. Atividade metabólica.....	17
4.1.5. Maturação do sistema imune.....	18
4.2. Enterocolite necrosante	20
4.3.Doença atópica.....	21
5. Uso como probióticos.....	22
6.Conclusão	23
7. Bibliografia.....	24

Resumo

O leite materno é a fonte de nutrientes de eleição para o recém-nascido e a sua composição varia ao longo da lactação com a produção de três tipos de leite: colostro, leite de transição e leite maduro. Longe de ser um fluido estéril, o leite materno é fonte de bactérias, representadas maioritariamente pelos géneros *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Contrariamente ao que se acreditava, estas bactérias não resultam de contaminações e têm origem no lúmen intestinal materno, de onde são transportadas até às glândulas mamárias através de células dendríticas. Fatores como o peso corporal da mãe, estado hormonal durante o parto, período de lactação e estado de saúde materna influenciam a composição bacteriana do leite materno.

Esta composição permite uma colonização inicial do intestino do recém-nascido adequada, evitando a disrupção da homeostase intestinal envolvida na patogénese de várias doenças. Assim, a amamentação de recém-nascidos com leite materno está associada a uma redução da incidência e do risco de desenvolvimento de várias patologias, quer a curto como a longo prazo, como a enterocolite necrosante e a doença atópica. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm elucidado acerca dos mecanismos envolvidos na sua ação protetora, que podem incluir: exclusão competitiva, função de barreira intestinal, produção de compostos antimicrobianos, atividade metabólica e maturação do sistema imune.

Vários estudos indicam a possibilidade de isolamento das bactérias do leite materno e a sua administração sob a forma de probióticos, em situações onde a amamentação não é aconselhável, com potencial aplicação para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas.

Abstract

Breast milk is the source of nutrients of choice for the newborn and its composition varies throughout lactation with the production of three types of milk: colostrum, transitional milk and mature milk. Far from being a sterile fluid, breast milk is a source of bacteria, mainly represented by the genera *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* and *Streptococcus*. Contrary to what was believed, these bacteria are not the result of contamination and originate from the maternal intestinal lumen, where they are transported to the mammary glands via dendritic cells. Factors such as mother's body weight, hormonal status during labor, lactation and maternal health status, influence the bacterial composition of breast milk.

This composition enables an appropriate initial colonization of the intestine of newborn, preventing the disruption of intestinal homeostasis involved in the pathogenesis of various diseases. Thus, breastfeeding of newborns with breast milk is associated with a reduced incidence and risk of developing various diseases, both in the short and long term, such as necrotizing enterocolitis and atopic disease. *In vivo* and *in vitro* studies have elucidated about the mechanisms involved in its protective action, which may include: competitive exclusion, intestinal barrier function, production of antimicrobial compounds, metabolic activity and maturation of the immune system.

Several studies indicate the possibility of isolation of bacteria from milk and its administration in the form of probiotics in situations where breastfeeding is not recommended, with potential application for treatment and prevention of infectious diseases.

I. Introdução

Recém-nascido (RN) é a denominação clínica usada em Pediatria para designar todas as crianças desde o nascimento até atingirem os 28 dias de vida. A partir desta data, e até ao fim do primeiro ano de vida, a criança passa a ser designada por lactente.

O RN, particularmente se prematuro, demonstra uma imaturidade das funções digestiva, metabólica e excretora, e o seu desenvolvimento ocorre durante os primeiros anos de vida (Laurindo & Calil, 1992). Embora estejam sobre a influência genética, estas mudanças podem ser moduladas pela dieta. O leite materno (LM) é a fonte de nutrientes de eleição para o RN e, por isso, foi recomendado como guia para estabelecer os níveis máximos e mínimos dos componentes das fórmulas infantis (Robinson & Fall, 2012).

As fórmulas infantis mais utilizadas no mercado têm como matéria-prima o leite de vaca, que não é apropriado para a alimentação do RN, necessitando de uma série de adaptações para se tornar mais digerível e absorvível. As principais modificações que podem ser feitas incluem a redução do teor de proteínas e eletrólitos, substituição de parte dos lípidos por óleo vegetal, adição de hidratos de carbono como a sacarose, e adição de vitaminas e minerais (Costa., 2012). Estes leites estão disponíveis sobre a forma de pó, para serem reconstituídos em água, pelo que o seu manuseamento requer alguns cuidados de forma a evitar possíveis contaminações.

Apesar destas fórmulas tentarem mimetizar os componentes do LM, existem algumas diferenças (Piacentini *et al.*, 1995). O leite artificial, embora em menor percentagem do que o leite de vaca, contém grandes quantidades de proteínas (caseína), sobrecarregando o sistema renal com substâncias dissolvidas, designadamente de fenilalanina e tirosina, aminoácidos para os quais os RNs apresentam baixa capacidade de metabolização. Em contraste com o LM, o leite de fórmulas infantis contém beta-lactoglobulina, que é considerada altamente alérgica. Por outro lado, a sua composição é pobre em oligossacáridos que podem exercer diversas funções, entre as quais, favorecer a flora intestinal com a colonização de bactérias benéficas para o intestino.

Além disso, embora o conteúdo em minerais das fórmulas lácteas, nomeadamente de Ferro e Cálcio, seja superior ao do LM, este compensa a sua baixa percentagem através de uma maior biodisponibilidade. Adicionalmente, enzimas essenciais à digestão estão também presentes no LM, nomeadamente a lipase, que promove a digestão de lípidos, e as protéases que fazem o mesmo com proteínas.

Os RNs amamentados controlam melhor a quantidade de leite que ingerem e aprendem a auto-regular a ingestão de energia, o que permanece com eles na vida futura.

Assim, em comparação com RNs alimentados com fórmulas, os amamentados ganham peso mais lentamente na infância, o que está associado a menor risco de desenvolver obesidade no futuro (Robinson & Fall, 2012)(Hester *et al.*, 2012).

O LM suporta o desenvolvimento neurocognitivo, através do fornecimento de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, que são encontrados em altas concentrações no cérebro durante o período de rápido crescimento. De facto, crianças amamentadas parecem ter uma melhor performance em testes cognitivos, comparativamente a crianças alimentadas com fórmulas (Robinson & Fall, 2012).

O LM é ainda composto por vários fatores de proteção, nomeadamente imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, bactérias benéficas, nucleótidos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos, e fatores de crescimento. Estes fatores, justificam assim a redução da incidência de diversas doenças em RNs amamentados, em comparação com RNs alimentados com fórmulas. Associados à amamentação estão, de facto, benefícios a curto e longo prazo na saúde do RN, que abrangem vários órgãos e tecidos.

O LM está adaptado às necessidades do RN, indo de encontro à maturidade do seu aparelho digestivo e tendo a capacidade de variar a sua composição consoante as necessidades e a fase de vida da criança. Não pode, assim, ser substituído por nenhuma fórmula infantil, cuja composição é sempre constante.

Além das vantagens nutricionais e protetoras, a amamentação propicia o estabelecimento do vínculo afetivo entre a mãe e o RN, satisfazendo as suas necessidades emocionais (Costa, 2012).

Devido à superioridade do LM em relação aos outros tipos de leite, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde, recomendam que o lactente seja alimentado exclusivamente com LM durante os primeiros seis meses de vida. A partir desse período, este deve ser consumido de forma complementar pelo menos até aos dois anos de idade (Costa, 2012).

2. Leite materno

2.1. Tipos de leite materno

Devido à imaturidade das glândulas mamárias, a composição do leite produzido pela mãe vai sofrendo alterações ao longo do tempo (Laurindo, *et al.*, 1992). Assim, o período de produção do LM, designado de período de lactação, pode ser dividido em três fases, havendo produção de três tipos de leite: o colostro, o leite de transição, e o leite maduro (Kulski & Hartmann, 1980).

O colostro é o primeiro fluido biológico produzido pelas glândulas mamárias, no fim da gravidez e durante os primeiros cinco dias após o parto. Apesar de ser produzido em baixa quantidade, contém grande concentração de nutrientes e elementos do sistema imune, incluindo imunoglobulinas, células imunocompetentes e citocinas (Jiménez, *et al.*, 2008a). A composição do colostro está bem adaptada às necessidades do RN. Contém uma reduzida quantidade de lactose e glucose, o que é essencial, na medida em que as enzimas intestinais, nesta fase, ainda estão a ser produzidas. Este facto reforça a função imunológica, e não apenas nutricional, deste primeiro leite (Ballard & Morrow, 2013). Quando comparado ao leite maduro, é mais viscoso, possuindo concentrações mais elevadas de proteínas, minerais, carotenóides e vitaminas lipossolúveis, particularmente A e E. Os níveis de sódio, cloro e magnésio são mais elevados e os níveis de potássio e cálcio são menores no colostro do que no leite maduro (Costa, 2012).

À medida que as junções do epitélio mamário se estreitam, verifica-se uma diminuição da concentração em minerais e proteínas, que é acompanhada pelo aumento da concentração de gorduras e hidratos de carbono, incluindo a lactose, indicando ativação da secreção e produção do leite de transição (Ballard & Morrow, 2013). A fase de transição corresponde a um período de grande produção de leite, de forma a suportar as necessidades nutricionais neste período de rápido crescimento e, geralmente, ocorre entre o quinto dia até duas semanas após o parto.

Na quarta ou sexta semana, o leite humano é considerado totalmente maduro. A composição do leite maduro varia ao longo de uma mamada, pelo que a sua concentração em proteínas, lactose, vitaminas, minerais e água vai diminuindo, à medida que a quantidade de lípidos aumenta. Apesar desta variação, e em contraste com as mudanças drásticas na composição do leite observadas durante o primeiro mês de vida, a composição do leite maduro permanece relativamente estável (Ballard & Morrow, 2013).

2.2. Composição bacteriana do leite materno

Estudos recentes têm demonstrado que o LM, longe de ser um fluido estéril, constitui uma excelente e contínua fonte de bactérias comensais para o intestino (Tabela I) (Lara-Villoslada *et al.*, 2007). A ingestão de 800 ml de LM por dia pode corresponder a uma ingestão de 5-7 \log_{10} UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de bactérias comensais (Jiménez *et al.*, 2008a).

No início do século XXI, foi demonstrada a presença de bactérias ácido-láticas (BALs) no LM, nomeadamente as pertencentes aos géneros *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*. As espécies maioritariamente representadas são *Enterococcus faecium* (Jiménez *et al.*, 2008a), *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum* (Heikkilä & Saris, 2003; Lara-Villoslada *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2003) e *Lactobacillus reuteri* (Sinkiewicz & Ljunggren, 2008). Outros estudos identificaram a presença de BALs pertencentes ao género *Streptococcus*, maioritariamente representado por *Streptococcus salivarius* (Solís *et al.*, 2010), *Streptococcus thermophilus* (Perez *et al.*, 2007) e *Streptococcus lactarius* (Fernández *et al.*, 2013).

Para além das BALs no LM, foram também identificadas bactérias do género *Staphylococcus* e *Bifidobacterium*, sendo as espécies mais representativas *Staphylococcus epidermidis* (Jiménez *et al.*, 2008a; Jiménez *et al.*, 2008b; Solís *et al.*, 2010), *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium longum*, respetivamente (Martín *et al.*, 2003; Solís *et al.*, 2010). Bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* foram ainda detetadas, embora em número bastante reduzido (Jiménez *et al.*, 2008a).

As espécies de *Staphylococcus* (*S. epidermidis*) e *Enterococcus* isoladas do LM contêm um baixo número de fatores de virulência e são sensíveis à maioria dos antibióticos (Jiménez *et al.*, 2008a; Jiménez *et al.*, 2008b).

Mais recentemente, foi estabelecido o chamado “core” da microbiota do LM, constituído por um grupo de bactérias que é conservado entre mulheres em lactação e estável no tempo. São nove os géneros das bactérias que o constituem: *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e ainda géneros pertencentes à família *Bradyrhizobiaceae*. Contrariando estudos anteriores que indicam a sua prevalência no LM, a presença de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* não foi detetada em todas as mulheres estudadas, o que excluiu estes dois géneros do “core” do LM. Variáveis genéticas, ambientais, culturais, e nutricionais poderão estar na origem destas diferenças (Hunt *et al.*, 2011).

Tabela I: Composição bacteriana do leite materno

Filo	Género	Espécie
Firmicutes	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. fermentum</i> , <i>L. Gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. salivarius</i>
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactarius</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. termophilus</i>
	<i>Leuconostoc</i>	
	<i>Lactococcus</i>	
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i>
	<i>Corynebacterium</i>	
	<i>Propionibacterium</i>	
Proteobacteria	<i>Ralstonia</i>	
	<i>Serratia</i>	
	<i>Sphingomonas</i>	

2.3. Origem das bactérias do leite materno

A contaminação das amostras de LM é quase inevitável, pelo que, dúvidas surgem relativamente à origem destas bactérias (Fernández *et al.*, 2013; Jeurink *et al.*, 2013; Jiménez *et al.*, 2008a).

Inicialmente, acreditava-se que a sua presença resultava da contaminação por bactérias colonizadoras da pele e da cavidade oral do RN, exposto à microbiota vaginal e intestinal da mãe aquando do nascimento (Cabrera-rubio *et al.*, 2012). De facto, as bactérias típicas da cavidade oral incluem as pertencentes ao género *Streptococcus*, as quais podem também ser encontradas no LM. No entanto, a possibilidade do seu isolamento, em amostras de leite colhidas antes do nascimento, isto é, mesmo antes de o LM ser submetido a qualquer contacto com o RN, sugere que estas bactérias têm origem endógena. Estas apresentam, inclusive, semelhanças às isoladas do LM fresco obtido após o parto (Cabrera-rubio *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013).

Outra possível fonte das bactérias presentes no LM poderia ser a pele materna. No entanto, bactérias isoladas da pele humana, como *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*, apesar de partilharem alguns filotipos com as encontradas no LM, apresentam diferenças que sugerem que as espécies presentes no LM não resultam apenas

de contaminação com a pele materna (Fernández *et al.*, 2013). Por exemplo, o género *Streptococcus* representa menos de 10% das bactérias da pele; se fossem apenas contaminantes, seria de esperar que, não só partilhassem vários filotipos, como também a abundância dos filotipos fosse semelhante, o que não se verifica. O mesmo ocorre com o género *Propionibacterium*, que, sendo muito abundante na pele, não o é no LM (Hunt *et al.*, 2011).

Vários outros argumentos suportam a ideia de que a microbiota do LM não resulta de uma mera contaminação. Por exemplo, espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* isoladas em amostras de LM não foram detetadas na pele dessas mesmas mulheres. Além disso, bactérias anaeróbias restritas, que crescem apenas na ausência de oxigénio, como é o caso de espécies de *Bifidobacterium*, não conseguem sobreviver num ambiente aeróbio como a pele (Jeurink *et al.*, 2013). Outro exemplo é dado pelo isolamento de BALs genotipicamente distintas a partir de amostras de pele e de LM obtidas da mesma mulher (Fernández *et al.*, 2013; Jeurink *et al.*, 2013).

Em conclusão, vários estudos sugerem que a pele tem, se tiver, um papel secundário, na constituição da microbiota do LM. A deteção no LM de bactérias administradas por via oral a mulheres em lactação, reforça a ideia de que estas têm uma origem maioritariamente endógena (Jeurink *et al.*, 2013).

Estando demonstrada a origem endógena das bactérias do LM, questiona-se a forma como estas chegam às glândulas mamárias. Vários autores sugerem a hipótese de que as bactérias têm origem na microbiota intestinal da mãe, sendo transportadas até às glândulas mamárias através de células dendríticas (CDs). Estas células, localizadas nas placas de Peyer da mucosa intestinal, são capazes de abrir as junções existentes entre as células epiteliais intestinais e, através das suas dendrites, ocorre endocitose das bactérias presentes no lúmen intestinal. Estas podem permanecer viáveis entre 10-60 horas nos nódulos linfáticos mesentéricos e, uma vez internalizadas, podem espalhar-se para outros locais, nomeadamente, para as glândulas mamárias, devido à circulação de células imunes no sistema linfóide associado à mucosa (Figura I) (Jeurink *et al.*, 2013).

Corroborando esta hipótese, existem evidências de que o mesmo ADN (ácido desoxirribonucleico) bacteriano é encontrado nas fezes da mãe, no LM, nas células sanguíneas e nas fezes dos RNs, o que sugere que as bactérias sofrem translocação através da corrente sanguínea e percorrem o trajecto: intestino – sangue – LM- fezes do RN (Jeurink *et al.*, 2013).

Há evidências de que as placas de Peyer presentes em murganhos fêmea gestantes e em lactação são macroscopicamente maiores, com uma camada subepitelial mais proeminente e vasos linfáticos mais dilatados, comparativamente a murganhos fêmea virgens. Este facto suporta a ideia de que as CDs podem estar implicadas no transporte de compostos microbianos através do intestino (Perez *et al.*, 2007).

A translocação bacteriana, que ocorre no fim da gravidez e durante a lactação, é facilitada por mudanças fisiológicas e hormonais durante este período. Durante a gravidez, o crescimento mamário ocorre essencialmente devido ao aumento dos ductos e alvéolos. Deste modo, o aumento de aporte sanguíneo à glândula mamária, juntamente com a libertação de oxitocina, hormona responsável pela contração das células epiteliais que revestem o alvéolo mamário, podem promover este mecanismo de passagem das células bacterianas do intestino para o LM (Jeurink *et al.*, 2013).

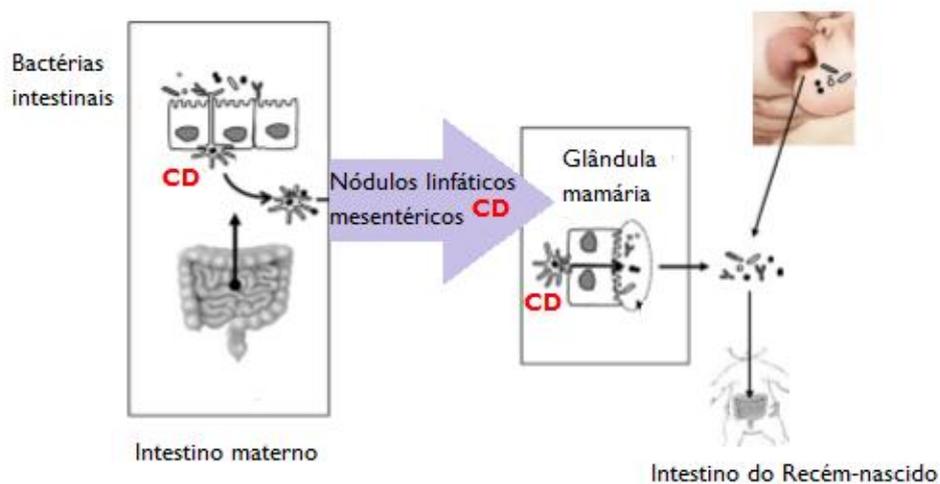


Figura 1: Via entero-mamária; CD - células dendrítica (Adaptado de (Fernández *et al.*, 2013))

2.4. Fatores que influenciam a composição bacteriana do leite materno

Sendo as bactérias do LM provenientes do lúmen intestinal da mãe, os fatores que influenciam a sua colonização intestinal e o seu estado de saúde em geral, influenciarão também a microbiota do LM.

Estudos referem que fatores como o peso corporal da mãe, o tipo de parto e o período de lactação têm impacto na composição bacteriana do LM (Cabrera-rubio *et al.*, 2012; Jeurink *et al.*, 2013).

Recentemente, demonstrou-se que o microbioma do LM de mães obesas ou com excesso de peso ($IMC \geq 30$) durante a gravidez, difere de mães com peso normal ($IMC \leq 25$). O LM produzido por mães obesas tem uma composição bacteriana mais homogênea e menos dispersa, e associada a maiores quantidades de *Lactobacillus* e *Staphylococcus*, particularmente *S. aureus*. Por outro lado, verifica-se uma redução na percentagem de *Bifidobacterium* (Cabrera-rubio et al., 2012).

Comparativamente a mães cujo parto é natural, mães que são submetidas a cesariana produzem leite com menor diversidade bacteriana. Surpreendentemente, partos por cesariana não planeada estão associados à produção de LM com um perfil microbiano mais semelhante ao primeiro grupo. Este facto sugere que é o estado hormonal da mãe e o stress fisiológico que têm impacto na composição bacteriana do LM, e não o tipo de parto (Cabrera-rubio et al., 2012).

O período de lactação está também associado a variações na prevalência das espécies bacterianas. No primeiro dia após o parto, o colostro é constituído maioritariamente por *Streptococcus* e *Staphylococcus*, nomeadamente *S. salivarius* e *S. epidermidis*. Esta prevalência mantém-se ao longo da lactação, embora a percentagem de *Lactobacillus* e *Enterococcus* aumente no leite de transição. A partir do trigésimo dia após o parto, espécies de *Enterococcus* desaparecem, e o leite maduro sofre contínuo aumento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, nomeadamente *B. breve*. O leite maduro analisado aos 90 dias, revela uma ligeira redução de *Bifidobacterium* e um ligeiro aumento de *Lactobacillus* (Solís et al., 2010).

3. Importância da microbiota do leite materno

3.1. Amamentação e colonização intestinal

O estabelecimento da população microbiana intestinal é um processo contínuo e dinâmico, que se inicia durante o parto, e prossegue por ação dos microrganismos que serão introduzidos com os primeiros alimentos.

Aquando do parto, e devido à abundância de oxigénio no intestino do RN, as primeiras bactérias colonizadoras são geralmente bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas como as Enterobacteria, Enterococci e Staphylococci, sendo as espécies mais representativas a *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Os metabolitos produzidos por estas primeiras espécies têm um papel importante na preparação do intestino para receber aquela que será a flora microbiana mais favorável, através do consumo do oxigénio presente no lúmen intestinal. A criação deste ambiente redutor torna-o

propício à colonização por bactérias anaeróbias restritas como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Bacteroides*.

Posteriormente, o tipo de alimentação influenciará fortemente o número e tipo de espécies que predominam (Guaraldi & Salvatori, 2012). Diferenças entre a composição microbiana do LM e de fórmulas infantis são, provavelmente, o principal fator responsável pelas diferenças observadas entre a microbiota intestinal de RNs amamentados e de RNs alimentados com fórmulas (Tabela 2) (Jiménez *et al.*, 2008b; Martín *et al.*, 2003).

A alimentação com LM exclusivo determina o crescimento de uma microbiota intestinal que é maioritariamente constituída por espécies de *Bifidobacterium*. A predominância destas bactérias resulta da presença de galacto-oligossacarídeos (GOs) no LM, produzidos exclusivamente nas secreções lácteas humanas. Conhecidos como fatores bifidogénicos, os GOs são utilizados como fonte de carbono apenas por algumas bactérias, devido à sua complexidade estrutural, designadamente por *Bifidobacterium* e *Bacteroides*. No entanto, a capacidade de crescer vigorosamente num meio onde os GOs são a única fonte de carbono é variável, sendo mais comum entre estirpes de *Bifidobacterium longum* subespécie *infantis* e *Bifidobacterium bifidum*. As espécies *B. longum* subespécie *longum* e *B. breve*, mostram crescimento moderado enquanto estirpes de *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium animalis* não possuem esta capacidade (Zivkovic *et al.*, 2011). De facto, estudos demonstram que *B. longum* subespécie *infantis* é típica do intestino de amamentados (Bode, 2012).

Para além destas, outros géneros podem ser encontrados na microbiota intestinal de RNs amamentados, nomeadamente *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus*. As espécies maioritariamente representadas são *E. faecalis*, *S. salivarius* (Solís *et al.*, 2010), *S. epidermidis* (Jiménez *et al.*, 2008b; Solís *et al.*, 2010), *L. gasseri* (Solís *et al.*, 2010) e *L. rhamnosus* (Guaraldi & Salvatori, 2012).

As mesmas espécies são também isoladas no LM, e apresentam um perfil genético semelhante, o que reforça o seu papel na constituição da microbiota intestinal do RN (Cabrera-rubio *et al.*, 2012; Solís *et al.*, 2010).

Pelo contrário, os RNs alimentados com leite de vaca ou outras fórmulas lácteas apresentam uma redução de bifidobactérias, ocorrendo crescimento de uma microflora idêntica àquela observada em adultos, constituída essencialmente por *Bacteroides* e *Firmicutes* (Guaraldi & Salvatori, 2012). Assim, estão presentes no seu intestino espécies de *Atopobium*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium* (*C. paraputrificum*, *C. perfringens*, *C. clostridiiforme*, *C. difficile*, e *C. tertium*), *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus* (*S. bovis*, *S. faecalis*, e *S.*

faecium) e *Veillonella parvula*. O género *Bacteroides* são representados por *B. vulgatus* e *B. fragilis*. Estão ainda presentes as espécies *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Guaraldi & Salvatori, 2012).

A espécie *S. epidermidis*, sendo a mais predominante no LM, está praticamente ausente das fezes dos RNs não amamentados, sendo um traço diferencial em relação à microbiota de lactentes amamentados (Jiménez *et al.*, 2008b). No entanto, entre o 1º e 2º ano de vida, as diferenças entre os dois grupos desaparecem e o perfil da microbiota assemelha-se à de um adulto (Guaraldi & Salvatori, 2012), o que sugere que o papel do LM é principalmente importante no início da colonização intestinal.

Tabela 2: Diferenças na microbiota intestinal de acordo com o tipo de alimentação

Género	Amamentação	Fórmulas lácteas
<i>Atopobium</i>		<i>Atopobium</i>
<i>Bacillus</i>	-	<i>B. subtilis</i>
<i>Bacteroides</i>	-	<i>B. vulgatus</i> <i>B. fragilis</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> (subespécie <i>infantis</i> e <i>longum</i>), <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i>	Em menor percentagem
<i>Clostridium</i>	-	<i>C. paraputrificum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. clostridiiforme</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. tertium</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Escherichia</i>	-	<i>E. coli</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. gasseri</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>Pseudomonas</i>	-	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	-
<i>Streptococcus</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. bovis</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>S. faecium</i>
<i>Veillonella</i>	-	<i>V. parvula</i>

3.2. Impacto e significado da microbiota do leite materno

A microbiota do intestino é fundamental em vários aspetos: oferece proteção contra a colonização de agentes patogénicos, promove o desenvolvimento da resposta imune, providencia nutrientes essenciais para o RN, e pode ainda influenciar o crescimento e diferenciação das células epiteliais intestinais (Guaraldi & Salvatori, 2012). A desregulação da sua microbiota está envolvida na patogénese de doenças onde o seu papel protetor, imunológico, nutritivo e metabólico são importantes, como doenças auto-imunes ou inflamatórias (Guaraldi & Salvatori, 2012).

O LM, como fonte de bactérias comensais benéficas para o hospedeiro, permite alcançar um estado de homeostase intestinal, ou seja, um balanço equilibrado entre bactérias comensais e bactérias patogénicas. Além disso, permite a colonização inicial adequada do ecossistema intestinal ainda imaturo e pouco funcional do RN, onde a presença de microrganismos patogénicos poderia ser extremamente prejudicial. Este facto justifica que a amamentação de RNs com LM esteja associada a uma redução da incidência e do risco de desenvolvimento de várias patologias, tanto a curto como a longo prazo (Stuebe, 2009).

4. Benefícios do leite materno a curto e a longo prazo

Os benefícios do LM a curto prazo incluem a redução de infeções gastrointestinais provocadas por bactérias patogénicas como *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersenia enterocolitica* ou *Clostridium perfringens*, assim como de diarreia e enterocolite necrosante (Lara-Villoslada *et al.*, 2007; Maldonado *et al.*, 2012; Robinson & Fall, 2012). A exposição dos amamentados às bactérias do LM está também associada à redução de infeções do trato orofaríngeo, nomeadamente de otite média aguda (Lara-Villoslada *et al.*, 2007) e amigdalite (Heikkila & Saris, 2003). Verifica-se ainda diminuição da incidência de meningite provocada por *Haemophilus influenzae* (Lara-Villoslada *et al.*, 2007), de pneumonia e de infeções urinárias (Lara-Villoslada *et al.*, 2007). Em amamentados, verifica-se ainda uma melhor produção de anticorpos em resposta à vacinação contra poliomielite, tétano, difteria e gripe (Lara-Villoslada *et al.*, 2007).

A longo prazo, a amamentação pode proteger contra a doença inflamatória intestinal, diabetes tipo 1 e 2 (Vaarala, 2012) (Robinson & Fall, 2012), assim como doenças atópicas (Lara-Villoslada *et al.*, 2007; Rautava *et al.*, 2012). Além disso, verifica-se diminuição de obesidade (Jeurink *et al.*, 2013), colesterol (Varavallo *et al.*, 2008), desenvolvimento de doença celíaca (Akobeng *et al.*, 2006) e artrite reumatóide (Sorini & Falcone, 2013).

4.1. Mecanismos de ação da microbiota intestinal

Embora os mecanismos através dos quais as bactérias oriundas do LM exercem o seu efeito benéfico ainda não sejam completamente conhecidos, estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que estas podem atuar por: exclusão competitiva, formação da barreira epitelial,

produção de compostos antimicrobianos, atividade metabólica e/ou por maturação do sistema imune (Figura 2).

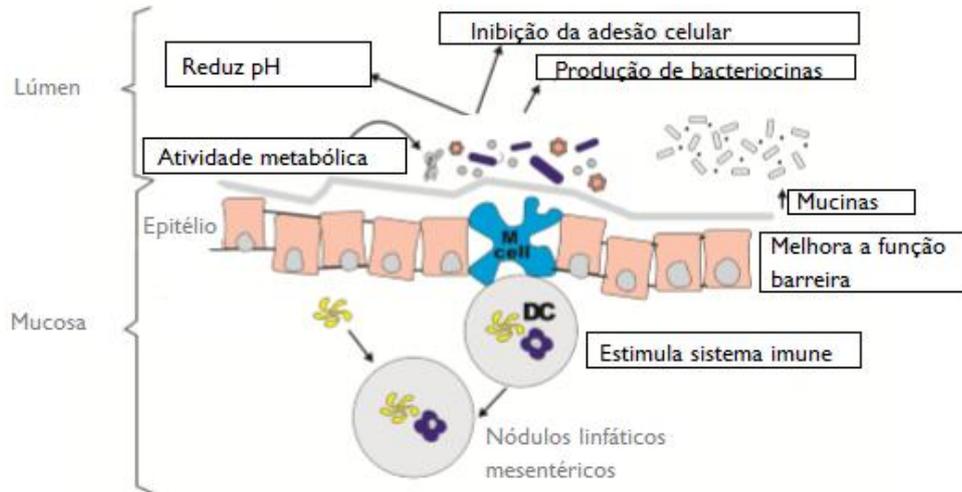


Figura 2: Mecanismo de ação das bactérias do leite materno no intestino do RN (Adaptado de (Hickson, 2011))

4.1.1. Exclusão competitiva

A exclusão competitiva representa a competição entre as bactérias do LM e bactérias patogênicas por locais de ligação às membranas das células epiteliais intestinais. Esta competição promove a barreira física da mucosa e impede o estabelecimento de microrganismos patogênicos no intestino. Além disso, estas bactérias competem por nutrientes necessários ao crescimento bacteriano.

Elevadas taxas de adesão celular têm sido descritas para o gênero *Lactobacillus* (Rautava *et al.*, 2012).

4.1.2. Barreira intestinal

Apesar da adesão das bactérias à superfície da mucosa intestinal ser o principal fator que determina a translocação de bactérias, a natureza da barreira intestinal influencia a incidência dessa translocação.

As bactérias provenientes do LM podem melhorar a função da barreira epitelial, através do aumento da produção de mucinas e diminuição da permeabilidade intestinal. As mucinas formam uma camada de glicoproteínas que, quando em contacto com a água, originam um filme que lubrifica e protege o epitélio contra agentes patogênicos, constituindo assim uma barreira física entre este e o lúmen intestinal.

Estudos sugerem que a ação de *L. fermentum*, *L. salivarius* e *L. gasseri* pode estar relacionada com a regulação de genes que promovem a expressão de mucinas pelas células produtoras de muco que revestem o epitélio intestinal, as células caliciformes (Olivares, et al., 2006).

A permeabilidade intestinal é superior em RNs alimentados com fórmulas infantis, comparativamente a RNs amamentados, uma vez que a introdução de proteínas alimentares ou agentes patogénicos estimulam uma resposta inflamatória intestinal, facilitando a penetração de bactérias e vírus (Fernández et al., 2013).

4.1.3. Produção de compostos antimicrobianos

Várias bactérias produzem uma variedade de compostos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio, óxido nítrico e bacteriocinas, que aumentam a sua capacidade para competir com agentes patogénicos.

A produção de ácido láctico pelas BALs provenientes do LM diminui o pH do lúmen intestinal, o que inibe o crescimento de bactérias patogénicas Gram negativas, como *E. coli*, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, responsáveis por infeções gastrointestinais (Lara-Villoslada et al., 2007).

Algumas bactérias produzem ainda peptídeos antimicrobianos, como as bacteriocinas, que podem atuar nos poros das membranas das bactérias ou interferir com enzimas essenciais à atividade de bactérias suscetíveis (Servin, 2004). Por exemplo, *Lactobacillus reuteri* produz a bacteriocina reuterina (Lara-Villoslada et al., 2007) o que pode explicar a diminuição da ocorrência de diarreia associada a esta espécie (Shornikova, et al., 1997).

4.1.4. Atividade metabólica

Durante o seu crescimento no lúmen intestinal, as bactérias do LM formam produtos resultantes do seu metabolismo. Entre esses metabolitos estão vitaminas essenciais como a vitamina k e a maioria das vitaminas hidrossolúveis do complexo B, como a biotina, cobalamina e riboflavinas, que são absorvidas pelo hospedeiro, melhorando o seu crescimento (Lara-Villoslada, et al., 2007).

Adicionalmente, a capacidade de produção de niacina por bifidobactérias diminui o fluxo de ácidos gordos livres e a biossíntese de VLDL, resultando em níveis diminuídos de triglicéridos e colesterol (Varavallo, et al., 2008).

São também produzidos ácidos gordos de cadeia curta, como propionato, acetato e butirato, derivados da fibra e hidratos de carbono fermentáveis que não são digeridos no

trato digestivo superior (Guzman, et al., 2013). O butirato é um fator anti-inflamatório que induz a síntese de mucinas e regula a integridade epitelial. Desta forma, aumenta os mecanismos de barreira e diminui o transporte de bactérias através do epitélio intestinal (Vaarala, et al., 2012). Um estudo recente indica que este composto permite a diferenciação de células T em células T reguladoras, importantes na contenção da resposta inflamatória excessiva assim como nas doenças auto-imunes (Furusawa, et al., 2013).

A ausência de bactérias produtoras de butirato parece estar relacionada com a autoimunidade das células β do pâncreas que ocorre na diabetes tipo I. De entre as bactérias do LM produtoras de butirato estão as do género *Lactobacillus*, e as bifidobactérias que, enquanto produtoras de lactato, podem também contribuir para a sua produção.

4.1.5. Maturação do sistema imune

Ao nascimento, o sistema imune do RN, ainda imaturo, é fortemente estimulado por ação das bactérias que lhe são transmitidas através da amamentação.

Estas bactérias, uma vez no intestino, são fagocitadas por CDs presentes na lâmina própria, que conseguem estender as suas dendrites entre os enterócitos até o lúmen intestinal. Esta interação leva à maturação das CDs e à libertação de citocinas, que possibilitam uma resposta madura de células T-helper (Th1 e Th2) e a maturação das células B em células produtoras de IgA. Esta, por sua vez, previne a penetração de bactérias ao nível da mucosa intestinal. De forma a evitar uma resposta imune excessiva e exacerbada, esta é cessada através da maturação das células T reguladoras que, mediante a libertação de uma citocina (TGF- β), medeia a regulação das respostas imunes humoral e celular (Walker, 2008).

Estes mecanismos são críticos para que o sistema imune seja capaz de prevenir a proliferação bacteriana em excesso e conseqüente translocação sistémica, ao mesmo tempo que é tolerante à microbiota comensal existente (Walker, 2008). No entanto, este mecanismo de tolerância apenas é desenvolvido quando a colonização do intestino é feita por bactérias comensais, e apenas quando esta ocorre na fase inicial da vida, pelo que a colonização por bactérias benéficas do LM é fundamental. Desequilíbrios entre a resposta Th1 e Th2 podem ocorrer devido à colonização inadequada do intestino, levando assim ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais crónicas, como a enterocolite necrosante, e doenças auto-imunes/alérgicas, como a dermatite atópica (Walker, 2008). Este facto justifica a maior incidência destas doenças em RNs alimentados com fórmulas (Neu, & Walker, 2011).

A diversidade de efeitos benéficos que decorrem da amamentação, pode resultar da ação, não de apenas uma, mas de várias espécies bacterianas constituintes da microbiota do LM, que atuam sinergisticamente através de um ou vários mecanismos (Tabela 3).

Tabela 3: Espécies bacterianas responsáveis pelos benefícios da amamentação com LM e possíveis mecanismos de ação

Benefício	Espécie Bacteriana	Mecanismos de ação	Referências
Colesterol	<i>B. longum</i> <i>E. faecium</i>	Produção de niacina	(Varavallo, et al., 2008)
Diabetes tipo I	<i>B. adolescentis</i> <i>Lactobacillus</i>	Produção de butirato	(Vaarala, 2012)
Diarreia	<i>B. breve</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>E. faecium</i> <i>L. reuteri</i>	↑ Biodisponibilidade de nutrientes; ↑ Produção de mucinas, ácido acético e lático; Produção de reuterina	(Hickson, 2011; Lara-Villoslada et al., 2007; Saavedra, 2001) (Shornikova et al., 1997)
Dermatite atópica	<i>L. rhamnosus</i> <i>B. breve</i>	↑ TGF-β	(Rautava et al., 2012) (Mikami et al., 2012)
Enterocolite necrosante	<i>B. breve</i> <i>L. casei</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i> <i>S. thermophilus</i>	Melhora motilidade intestinal ↓ Resposta inflamatória ↑ Barreira intestinal	(Bin-Nun et al., 2005; Braga et al., 2011)
Infeção gastrointestinal por <i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>S. salivarius</i> <i>L. rhamnosus</i>	Produção de compostos antimicrobianos	(Heikkila & Saris, 2003)
Infeção por <i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>L. gasseri</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. fermentum</i>	Produção de mucinas e ácido láctico, Adesão celular	(Olivares et al., 2006)
Amigdalites e otites médias	<i>S. salivarius</i>	Produção de bacteriocinas (contra <i>Streptococcus pyogenes</i>)	(Burton et al., 2013)
Melhor resposta à vacinação	<i>L. fermentum</i>	Estimulação do sistema imune (células NK e CélulasT, resposta Th1)	(Fernández et al., 2013; Maldonado et al., 2012)

4.2. Enterocolite necrosante

A mais clara relação entre interrupção da homeostase intestinal e doença verifica-se no desenvolvimento de enterocolite necrosante (EN). Esta doença caracteriza-se pela inflamação e morte do tecido intestinal e resulta da ação combinada da prematuridade e imaturidade intestinal.

Os prematuros são colonizados por uma menor quantidade e diversidade de bactérias, o que se traduz na diminuição dos mecanismos de resistência à colonização e consequente penetração de outras bactérias, potencialmente patogénicas (Neu, & Walker, 2011).

Além disso, e em contraste com os enterócitos maduros, que conseguem distinguir entre bactérias comensais e bactérias patogénicas, os enterócitos fetais, acostumados a um ambiente intra-uterino estéril, não estão preparados para a estimulação excessiva, própria da colonização intestinal pós-natal.

A combinação destes fatores, resulta assim numa resposta inflamatória exacerbada e inapropriada, que provoca dano das células epiteliais intestinais e aumenta a permeabilidade da mucosa. Desta forma, as bactérias patogénicas sofrem translocação através da barreira intestinal comprometida, potenciando a necrose intestinal (Grishin *et al.*, 2014) (Neu & Walker, 2011).

Em adição, e como resultado da translocação bacteriana, existe risco de septicémia, que é controlado com recurso a antibióticos. Estes, por sua vez, contribuem para uma inadequada colonização intestinal (Grishin *et al.*, 2014).

Lucas e colaboradores demonstraram que a natureza da alimentação é determinante no risco de desenvolvimento de EN e é, por isso, uma possível alternativa para a prevenção da doença. Os prematuros alimentados com fórmulas lácteas apresentam um risco seis a dez vezes maior de desenvolver EN, relativamente a prematuros exclusivamente alimentados com LM (Lucas, & Cole, 1990). Recentemente, uma diminuição na ocorrência de EN foi associada à eliminação dos produtos de leite bovino da dieta de prematuros (Herrmann & Carroll, 2014).

A microbiota do LM pode diminuir a EN através da redução da colonização intestinal por bactérias patogénicas, promoção da função barreira e diminuição da resposta inflamatória (Claud & Walker, 2001). Embora esta doença não esteja associada a nenhuma espécie bacteriana em particular, vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de identificar as bactérias presentes no LM que podem ser responsáveis por este efeito protetor. Estudos *in vivo* sugerem que as espécies *B. breve* e *Lactobacillus casei* (Braga *et al.*,

2011) têm a capacidade de prevenir a doença, assim como *B. infantis*, *B. bifidus* e *S. thermophilus* (Bin-Nun *et al.*, 2005).

4.3. Doença atópica

Durante as últimas décadas, a incidência de doenças atópicas, como asma, dermatite atópica e alergia alimentar, tem aumentado drasticamente. Embora a suscetibilidade genética tenha um papel importante na atopia, mudanças na prevalência destas doenças têm ocorrido muito mais rapidamente do que qualquer mudança na constituição genética possa justificar. Por isso, fatores ambientais, incluindo a alimentação, podem ter uma importante influência no desenvolvimento da doença, representando uma oportunidade de a prevenir ou retardar (Penders *et al.*, 2007).

Estudos mostram que, independentemente da hereditariedade, a colonização por *Lactobacillus* no início da vida protege contra o desenvolvimento de doença alérgica visto que este género está presente tanto no intestino de crianças saudáveis de pais alérgicos, como de pais não alérgicos. Além de *Lactobacillus*, crianças que não desenvolvem doença atópica estão também associadas a uma colonização intestinal por *B. bifidum* e *B. breve* (Johansson *et al.*, 2011) enquanto crianças com atopia apresentam maior número de *S. aureus* e *Clostridium perfringens* (Björkstén *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2011; Kim & Ji, 2012; Penders *et al.*, 2007) Estas diferenças na microbiota intestinal verificam-se nas primeiras semanas de vida e antes do aparecimento de qualquer sintoma clínico de atopia. No entanto, aos 12 meses de idade, crianças alérgicas e não alérgicas apresentam semelhança na frequência das diferentes espécies, sugerindo que é a microbiota inicial do intestino que influencia o futuro desenvolvimento da doença (Johansson *et al.*, 2011).

Existem evidências de que em crianças em risco de desenvolver atopia (i.e. com história familiar), a amamentação exclusiva durante, pelo menos, quatro meses, previne ou retarda a dermatite atópica. Porém, estes resultados não parecem ocorrer em crianças que não estejam em risco de desenvolver atopia (Oddy, 2009). Relativamente ao risco de desenvolver asma, ainda não foi demonstrado um efeito benéfico da amamentação exclusiva a longo prazo (6 anos de idade) (Johansson *et al.*, 2011).

O LM, sendo fonte contínua de bactérias benéficas, nomeadamente de *B. breve*, *B. bifidum* e de *Lactobacillus*, (Trindade, 2006) pode justificar os benefícios da amamentação no desenvolvimento deste tipo de doenças, descritos em vários estudos (Kim & Ji, 2012; Oddy, 2009).

Suportando esta interpretação, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram a capacidade de diferentes espécies de *Lactobacillus* isoladas do LM reduzirem o aparecimento de eczema e/ou a sensibilização por IgE.

O género *Lactobacillus*, nomeadamente as espécies *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, são capazes de modular variações genéticas nos recetores que o reconhecem à superfície de CDs. Devido ao seu importante papel como células apresentadoras de antígenos do sistema imune, estas variações possibilitam a redução da suscetibilidade ao desenvolvimento de doença atópica (Penders *et al.*, 2010).

5. Uso como probióticos

Apesar de raras, existem algumas situações em que o aleitamento materno não é aconselhável, nomeadamente em caso de infeções maternas com agentes de alta patogenicidade ou em situações de uso de medicamentos incompatíveis com a amamentação (Costa, 2012). Nestas situações, é necessário recorrer a fórmulas artificiais para alimentar os RNs, privando-os da aquisição das bactérias benéficas presentes no LM.

O isolamento de bactérias do LM foi realizado em vários estudos, e indica a possibilidade de estas serem administradas sob a forma de probióticos de forma a alcançar o principal objetivo das fórmulas: mimetizar o LM e os seus efeitos benéficos (Maldonado *et al.*, 2012).

Segundo a OMS, probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas. As bactérias isoladas do LM preenchem os principais requisitos para o uso de probióticos em humanos, uma vez que, têm origem humana, possuem história de segurança em situação de ingestão prolongada por uma população particularmente suscetível (RNs), e adaptam-se aos substratos da mucosa e da dieta (Fernández *et al.*, 2013). Além disso, são resistentes às condições gastrointestinais (ácido gástrico e biliar) e aderem à mucosa gastrointestinal, capacidade importante na medida em que influencia o tempo de residência no lúmen intestinal (Basavanna & Prapulla, 2013).

Deste modo, os probióticos podem ser administrados ao RN, permitindo a formação de uma microbiota intestinal mais favorável com conseqüente diminuição do risco de desenvolver diversas patologias. Adicionalmente, evitam-se tratamentos desnecessários que podem comprometer ainda mais a saúde da criança. Existe ainda a possibilidade de estas

serem administradas à mãe para que, através da amamentação, as bactérias benéficas sejam transmitidas ao filho.

Em Portugal, por exemplo, existem já probióticos aprovados para a prevenção e tratamento de diarreias induzidas por antibióticos e tratamento sintomático de diarreias não orgânicas, inclusive em crianças, constituídos por *L. casei* subespécie rhamnosus (Antibiophilus®).

Apesar da incorporação de bactérias probióticas em fórmulas infantis providenciar alguns benefícios, estas apenas veiculam uma espécie bacteriana e em doses maiores relativamente ao LM (Urbaniak, *et al.*, 2012), o que pode levantar algumas preocupações relativamente à sua segurança, nomeadamente na possibilidade de translocação de bactérias e consequente septicémia (Rautava *et al.*, 2012).

Embora esta situação não se tenha verificado em alguns estudos, outros indicam que situações de septicémia apenas ocorrem em crianças imunodeprimidas ou extremamente doentes. Assim, estudos adicionais precisam de ser realizados no sentido de identificar as estirpes ideais, as doses ótimas e, em caso de serem usadas para fins terapêuticos, a duração do tratamento necessária (Bin-Nun *et al.*, 2005).

6. Conclusão

O LM além de fornecer nutrientes, componentes bioativos e imunológicos, é também fonte de bactérias comensais, responsáveis pela colonização inicial do intestino do RN. Esta é uma etapa crucial para o seu crescimento saudável e para a aquisição dos mecanismos de proteção essenciais contra o desenvolvimento de diversas patologias.

De forma a explorar as potencialidades que podem advir da composição bacteriana do LM, nomeadamente na área da gravidez e lactação, será necessário adquirir um melhor entendimento acerca da associação entre o seu microbioma e os benefícios na saúde, bem como os potenciais fatores que influenciam esta relação.

Tal abordagem poderá ajudar as mães a amamentarem até aos seis meses de vida, como recomendado pela OMS. Além disso, em caso de doença materna grave que impossibilite totalmente este período de amamentação, poderá auxiliar na otimização da composição de fórmulas infantis para oferecer novas ferramentas na luta contra doenças. Estes exemplos enfatizam a possível magnitude da influência da microbiota do LM na saúde da criança, pedindo por isso mais atenção em pesquisas futuras.

7. Bibliografia

- Akobeng, A. K., Ramanan, A. V., Buchan, I., & Heller, R. F. (2006). Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Disease in Childhood*, *91*, 39–43. doi:10.1136/adc.2005.082016
- Ballard, O., Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America* *60*, 49–74. doi:10.1016/j.pcl.2012.10.002
- Basavanna, G., & Prapulla, S. G. (2013). Evaluation of functional aspects of *Lactobacillus fermentum* CFR 2195 isolated from breast fed healthy infants' fecal matter. *Journal of Food Science and Technology*, *50*, 360–6. doi:10.1007/s13197-011-0345-9
- Bin-Nun, A., Bromiker, R., Wilschanski, M., Kaplan, M., Rudensky, B., Caplan, M., & Hammerman, C. (2005). Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *The Journal of Pediatrics*, *147*, 192–6. doi:10.1016/j.jpeds.2005.03.054
- Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., & Mikelsaar, M. (2001). Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. *108*, 516–20. doi:10.1067/mai.2001.118130
- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, *22*, 1147–1162. doi:10.1093/glycob/cws074
- Braga, T. D., Alves, G., Israel, P., Lira, C. De, & Lima, M. D. C. (2011). Efficacy of *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei* oral supplementation on necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight preterm infants: a double-blind, randomized, controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. *6*, 81–86. doi:10.3945/ajcn.2010.29799.1
- Burton, J. P., Wescombe, P. A., Macklaim, J. M., Chai, M. H. C., Macdonald, K., Hale, J. D. F., Tagg, J., Reid, G., Gloor, G.B., & Cadieux, P. A. (2013). Persistence of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* M18 is dose dependent and megaplasmid transfer can augment their bacteriocin production and adhesion characteristics. *PloS One*, *8*, e65991. doi:10.1371/journal.pone.0065991

Cabrera-rubio, R., Collado, M. C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., & Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 96:544–511. doi:10.3945/ajcn.112.037382

Claud, E. C., & Walker, W. A. (2001). Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 15, 1398–403. doi: 0892-6638/01/0015-139

Costa, Érica Carla da - Caracterização microbiológica e físico-química de leite humano em diferentes períodos de lactação- 2012. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, *dissertação apresentada à Universidade Federal de Vila Viçosa*, 3-8 e 16-17

Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., & Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 69, 1–10. doi:10.1016/j.phrs.2012.09.001

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. a, Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N., Murakami, S., Miyanchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fugimara, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., & Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504, 446–50. doi:10.1038/nature12721

Grishin, A., Papillon, S., Bell, B., Wang, J., & Ford, H. R. (2014). The Role of the Intestinal Microbiota in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery*. 22, 69–75. doi:10.1053/j.sempedsurg.2013.01.002

Guaraldi, F., & Salvatori, G. (2012). Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 94. doi:10.3389/fcimb.2012.00094

Guzman, J. R., Conlin, V. S., & Jobin, C. (2013). Diet, microbiome, and the intestinal epithelium: an essential triumvirate? *BioMed Research International*. 2013, 425146. doi:10.1155/2013/425146

Heikkilä, M. P., & Saris, P. E. J. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 471–478. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02002.x

Herrmann, K., & Carroll, K. (2014). An exclusively human milk diet reduces necrotizing enterocolitis. *Breastfeeding Medicine: The Official Journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, 9, 184–90. doi:10.1089/bfm.2013.0121

Hester, S. N., Hustead, D. S., Mackey, A. D., Singhal, A., & Marriage, B. J. (2012). Is the macronutrient intake of formula-fed infants greater than breast-fed infants in early infancy? *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012, 891201. doi:10.1155/2012/891201

Hickson, M. (2011). Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 185–97. doi:10.1177/1756283X11399115

Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schütte, U. M. E., Beck, D. L., Abdo, Z., Fox, L.K., Williams, J.E., & McGuire, M. A. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS One*, 6, e21313. doi:10.1371/journal.pone.0021313

Jeurink, P. V., Van Berghenegouwen, J., Jiménez, E., Knippels, L. M. J., Fernández, L., Garssen, J., Knol, J., Rodríguez, J.M., & Martín, R. (2013). Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*, 4, 17–30. doi:10.3920/BM2012.0040

Jiménez, E., Delgado, S., Fernández, L., García, N., Albújar, M., Gómez, A., & Rodríguez, J. M. (2008a). Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Research in Microbiology*, 159, 595–601. doi:10.1016/j.resmic.2008.09.001

Jiménez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albújar, M., García, N., Jarrod, M., Fernández, L., Gómez, A., & Rodríguez, J. M. (2008b). *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiology*, 8, 143. doi:10.1186/1471-2180-8-143

- Johansson, M. A., Sjögren, Y. M., Persson, J.-O., Nilsson, C., & Sverremark-Ekström, E. (2011). Early colonization with a group of Lactobacilli decreases the risk for allergy at five years of age despite allergic heredity. *PLoS One*, 6, e23031. doi:10.1371/journal.pone.0023031
- Kim, N. Y., & Ji, G. E. (2012). Effects of probiotics on the prevention of atopic dermatitis, *Korean Journal of Pediatrics*. 55, 193–201. doi:10.3345/kjp.2012.55.6.193
- Kulski, J. K., & Hartmann, P. E. (1980). Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Australian Journal Experimental Biology & Medical Science*. 59, 101–114. doi: 10.1038/icb.1981.6
- Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Sierra, S., Rodríguez, J. M., Boza, J., & Xaus, J. (2007). Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *The British Journal of Nutrition*, 98, S96–100. doi:10.1017/S0007114507832910
- Laurindo, V. M., Calil, T., Leone, C.R., & Ramos, J.L.A. (1992) Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II - Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação . Vantagens em relação ao leite de vaca, *Pediatrics (São Paulo)*. 14, 24-9
- Lucas, A., & Cole, T.J. (1990) Breastfeeding and necrotizing enterocolitis. *Lancet* 336:1519-23
- Maldonado, J., Cañabate, F., Sempere, L., Vela, F., Sánchez, A. R., Narbona, E., Huertas, E.H.-, Geerlings, A., Valero, A.D., Olivares, M., & Lara-Villoslada, F. (2012). Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54, 55–61. doi:10.1097/MPG.0b013e3182333f18
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fenández, L., Rodríguez, J. M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. doi:10.1016/j.jpeds.2003.09.028
- Mikami, K., Kimura, M., & Takashashi, H. 2012. Influence of Maternal Bifidobacteria on the Development of Gut Bifidobacteria in Infants. *Pharmaceuticals*, 5, 629-642; doi:10.3390/ph5060629

Neu, J., & Walker, W.A. (2011). The New England Journal of Medicine, 364, 255–264. doi:10.1056/NEJMra1005408

Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Martín, R., Rodríguez, J.M., & Xaus, J. (2006). Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 72–79. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x

Penders, J., Thijs, C., Mommers, M., Stobberingh, E. E., Dompeling, E., Reijmerink, N. E., Van den Brandt, P.A., Kerkhof, M., Koppelman, G.H., & Postma, D. S. (2010). Intestinal lactobacilli and the DC-SIGN gene for their recognition by dendritic cells play a role in the aetiology of allergic manifestations. *Microbiology*, 156, 3298–305. doi:10.1099/mic.0.042069-0

Penders, J., Thijs, C., Van den Brandt, P. A, Kummeling, I., Snijders, B., Stelma, F., Adams, H., Van Ree, R., & Stobberingh, E. E. (2007). Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*, 56, 661–7. doi:10.1136/gut.2006.100164

Perez, P. F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E.J., & Donnet-Hughes, A. (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119, e724–32. doi:10.1542/peds.2006-1649

Piacentini, G.L., Borner, A.L., Richelli, C.C., & Gaburro, D. (1995). Artificial feeding: progresses and problems. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*. 31, 411-418

Rautava, S., Kainonen, E., Salminen, S., & Isolauri, E. (2012). Maternal probiotic supplementation during pregnancy and breast-feeding reduces the risk of eczema in the infant. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130, 1355–60. doi:10.1016/j.jaci.2012.09.003

Robinson, S., & Fall, C. (2012). Infant nutrition and later health: a review of current evidence. *Nutrients*, 4, 859–74. doi:10.3390/nu4080859

Saavedra, J. M. (2001). Clinical applications of probiotic agents. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, S1147–1151

Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 405–40. doi:10.1016/j.femsre.2004.01.003

- Shornikova, A.V., Casas, V., Isolauri, E., Mykkanen, H., & Vesikari, T. (1997). *Lactobacillus reuteri* as a Therapeutic Agent in Acute Diarrhea in Young Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 24, 399-404. doi: 10.1097/00005176-199704000-00008
- Sinkiewicz, G., & Ljunggren, L. (2008). Occurrence of *Lactobacillus reuteri* in human breast milk. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20, 122-126. doi: 10.1080/08910600802341007
- Solís, G., de Los Reyes-Gavilan, C. G., Fernández, N., Margolles, a, & Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*. 16, 307–10. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.02.004
- Sorini, C., & Falcone, M. (2013). Shaping the (auto)immune response in the gut: the role of intestinal immune regulation in the prevention of type I diabetes. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 2, 156–71. ISSN:2164-7712/AJCEI130400
- Stuebe, A. (2009). The Risks of Not Breastfeeding. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2, 222–231. doi:10.3909/riog0093
- Trindade, J. C. (2007). Prevenção primária da doença alérgica. *Acta Médica Portuguesa*. 20, 215-219
- Urbaniak, C., Burton, J.P., & Reid G. 2012. Breast, milk and microbes: a complex relationship that does not end with lactation. *Womens Health (London England)*. 8, 385-98. doi: 10.2217/whe.12.23
- Vaarala, O. (2012). Gut microbiota and type I diabetes. *The Review of Diabetic Studies (RDS)*. 9, 251–9. doi:10.1900/RDS.2012.9.251
- Varavallo, M. A., Thomé, J. N., & Teshima, E. (2008). Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*. 29, 83–104
- Walker, W. A. (2008). Mechanisms of action of probiotics. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46, 87-91. doi:10.1086/523335
- Weng, M., & Walker, W.A. (2013). The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 4, 1–23. doi:10.1017/S2040174412000712

Zivkovic, A. M., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2011). Human milk glycobioime and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*, S4653–8. doi:10.1073/pnas.1000083107